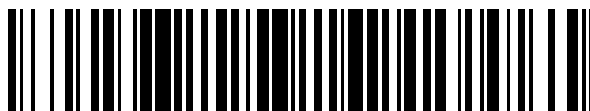


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 760 023**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.02.2014 PCT/US2014/017364**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.08.2014 WO14130657**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2014 E 14713280 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019 EP 2958943**

54 Título: **Tratamiento del cáncer utilizando receptor de antígeno quimérico anti-EGFRvIII humanizado**

30 Prioridad:

20.02.2013 US 201361767071 P
08.10.2013 US 201361888255 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.05.2020

73 Titular/es:

THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA (33.3%)
3160 Chestnut Street Suite 200
Philadelphia, PA 19104, US;
UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION (33.3%) y
NOVARTIS AG (33.3%)

72 Inventor/es:

BROGDON, JENNIFER;
LOEW, ANDREAS;
JOHNSON, LAURA ALEXANDRA;
JUNE, CARL H.;
MAUS, MARCELA;
SCHOLLER, JOHN y
OKADA, HIDEHO

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 760 023 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

Tratamiento del cáncer utilizando receptor de antígeno quimérico anti-EGFRvIII humanizado

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere generalmente al uso de células T diseñadas para expresar un Receptor de Antígeno Quimérico (CAR, por sus siglas en inglés) para tratar una enfermedad asociada con la expresión del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico III.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Aunque el sistema nervioso central (SNC) se considera a menudo inmunológicamente privilegiado (Okada et al., 2009, Crit Rev Immunol 29:1-42), estudios recientes de vacunas en pacientes con glioma maligno demostraron resultados positivos (Aguilar et al., 2012, Curr Treat Options Oncol 13:437-450; Ruzevick, et al., 2012, Neurosurg Clin N Am 23:459-470;15; y Okada et al., 2011, J Clin Oncol 29:330-336). Sin embargo, la eficacia de la vacuna, que depende de la actividad inmune del huésped intacta, puede sufrir una supresión sistémica de la inmunidad debido a la expresión del tumor de las citoquinas inmunosupresoras, así como a la quimioterapia y a la radioterapia. Por otro lado, la terapia de transferencia celular adoptiva (ACT, por sus siglas en inglés) con células T autólogas, especialmente con células T transducidas con Receptores de Antígeno Quimérico (CARs), ha demostrado ser prometedora en ensayos piloto de cáncer hematológico (Kalos et al., 2011, Sci Transl Med 3(95):95ra73; y Porter et al., 2011, New England Journal of Medicine 365:725-733).

La expresión potenciada del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés) se detecta con frecuencia en una diversidad de carcinomas, que incluyen de mama, pulmón, cabeza y cuello, así como glioblastoma. Los reordenamientos espontáneos dentro del gen del receptor del EGF se identificaron por primera vez en tumores de glioblastoma humano primario, y en casi todos los casos se ha informado de alteraciones en tumores con amplificación del EGFR. Tres tipos diferentes de mutantes resultan de estos reordenamientos. El más común es el receptor mutante por delección EGF de tipo III (EGFRvIII), que se caracteriza por la delección de los exones 2-7 en el ARNm del EGFR. Estas delecciones corresponden a los nucleótidos de ADNc 275-1075, que codifican los aminoácidos 6-276, presumiblemente a través de cortes y empalmes o reordenamientos alternativos. La delección de 801 pb dentro del dominio extracelular del gen EGFR provoca un truncamiento en el marco de la proteína EGFR normal, lo que da como resultado un receptor de 145 kDa, creando con ello un epítipo inmunogénico y específico para el tumor (revisado en Hatanpaa et al., 2010, Neoplasia 12:675- 684; Mukasa et al., 2010, Proc Natl Acad Sci USA 107:2616-2621). La expresión de EGFRvIII se ha observado en muchos tipos de tumores, incluido el glioblastoma multiforme (GBM), pero rara vez se observa en tejido normal. EGFRvIII se expresa en 24% a 67% de los casos de GBM, y en pacientes que sobreviven ≥1 año, la expresión de EGFRvIII es un indicador de pronóstico negativo independiente (Heimberger et al., 2005, Clin.Cancer Res. 11:1462-1466; Heimberger et al., 2005, J Transl. Med 3:38). Ohno et al. (2010, Cancer Science 101 (12): 2518-2524) describe un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión anti-EGFRvIII murino.

40 SUMARIO

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

La invención se refiere, entre otras cosas, composiciones y métodos para controlar una respuesta inmune en pacientes al proporcionar anticuerpos o fragmentos de anticuerpos optimizados y/o humanizados (p. ej., scFv) que se unen al Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico III (EGFRvIII) integrado en una construcción del Receptor de Antígeno Quimérico (CAR). Por ejemplo, pertenece al uso de células T diseñadas para expresar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a EGFRvIII, p. ej., un anticuerpo humanizado o fragmento de anticuerpo que se une a EGFRvIII, integrado en un CAR para tratar un cáncer asociado con la expresión de EGFRvIII. En algunos aspectos, pertenece a la transferencia celular adoptiva que puede ser particularmente adecuada para pacientes con glioma, porque la especificidad, el número y el fenotipo funcional de células preparadas ex vivo pueden ser manipulados y controlados mucho mejor que las células T nativas inducidas por la inmunización in vivo.

En esta memoria se describe una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que incluye un dominio de unión anti-EGFRvIII (p. ej., un anticuerpo humanizado o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a EGFRvIII), un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular (p. ej., un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio co-estimulante y/o un dominio de señalización primario). En un aspecto de la divulgación se describe un CAR que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que incluye un dominio de unión anti-EGFRvIII descrito en esta memoria (p. ej., un anticuerpo humanizado o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a EGFRvIII tal como se describe en esta memoria), un dominio transmembrana descrito en esta memoria y un dominio de señalización intracelular descrito en esta memoria (p. ej., un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio co-estimulante y/o un dominio de señalización primario).

65

Por lo tanto, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde dicho CAR comprende un dominio de unión anti-EGFRvIII, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio de señalización primario, un dominio co-estimulante, o tanto un dominio de señalización primario como un dominio co-estimulante, en donde el dominio de unión anti-EGFRvIII codificado comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 99% de identidad de la secuencia con SEQ ID NO:68 que comprende: (a) una región variable de inmunoglobulina de cadena pesada que comprende: (i) una CDR1 que comprende la secuencia DYYIH (SEQ ID NO: 22); (ii) una CDR2 que comprende la secuencia RIDPENDETKYGPIFQG (SEQ ID NO: 23); e (iii) una CDR3 que comprende la secuencia RGGVY (SEQ ID NO: 24); y (b) una región variable de inmunoglobulina de cadena ligera que comprende: (i) una CDR1 que comprende la secuencia KSSQSLDSDGKTYLN (SEQ ID NO: 26); (ii) una CDR2 que comprende la secuencia LVSKLDS (SEQ ID NO: 27); e (iii) una CDR3 que comprende la secuencia WQGTHFPGT (SEQ ID NO: 28)

En un aspecto de la divulgación, el dominio de unión anti-EGFRvIII codificado comprende una región variable de la cadena ligera descrita en esta memoria (p. ej., en la Tabla 2 o SEQ ID NO: 11) y/o una región variable de la cadena pesada descrita en esta memoria (p. ej., en la Tabla 2 o SEQ ID NO: 11). En un aspecto, el dominio de unión anti-EGFRvIII codificado es un scFv que comprende una cadena ligera y una cadena pesada de una secuencia de aminoácidos de la Tabla 2 o SEQ ID NO: 11. En un aspecto, el dominio de unión anti-EGFRvIII (p. ej., un scFv) comprende: una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (p. ej., sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (p. ej., sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena ligera proporcionada en la Tabla 2 o SEQ ID NO: 11, o una secuencia con un 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de la Tabla 2 o SEQ ID NO: 11; y/o una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (p. ej., sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (p. ej., sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena pesada proporcionada en la Tabla 2 o SEQ ID NO: 11, o una secuencia con un 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de la Tabla 2 o SEQ ID NO: 11. En un aspecto, el dominio de unión anti-EGFRvIII comprende una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 80, y SEQ ID NO: 86, o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma. En una realización de la invención, la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de unión anti-EGFRvIII comprende una secuencia de SEQ ID NO: 68. En una realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de unión anti-EGFRvIII comprende una secuencia de SEQ ID NO: 69 o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma. En un aspecto de la divulgación, el dominio de unión anti-EGFRvIII codificado es un scFv, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en esta memoria, p. ej., en la Tabla 2 o SEQ ID NO: 11, está unida a una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en esta memoria, p. ej., en la Tabla 2 o SEQ ID NO: 11, a través de un enlazador, p. ej., un enlazador descrito en esta memoria. El dominio de unión anti-EGFRvIII codificado puede incluir un enlazador (Gly₄-Ser)_n, en donde n es 1, 2, 3, 4, 5 o 6, preferiblemente 4 (SEQ ID NO: 110). La región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada de un scFv pueden estar, p. ej., en cualquiera de las siguientes orientaciones: región variable de la cadena ligera-enlazador-región variable de la cadena pesada o región variable de la cadena pesada-enlazador-región variable de la cadena ligera.

En una realización, el CAR codificado incluye un dominio transmembrana que comprende un dominio transmembrana de una proteína seleccionada del grupo que consiste en la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 y CD154. En una realización, el dominio transmembrana codificado comprende una secuencia de SEQ ID NO: 15. En una realización, el dominio transmembrana codificado comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (p. ej., sustituciones), pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones (p. ej., sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 o una secuencia con un 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15. En una realización, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el dominio transmembrana comprende una secuencia de SEQ ID NO: 8 o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma.

En una realización, el dominio de unión anti-EGFRvIII codificado está conectado al dominio transmembrana por una región de bisagra, p. ej., una región de bisagra descrita en esta memoria. En una realización, la región de bisagra codificada comprende SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 104 o SEQ ID NO: 106 o SEQ ID NO: 108, o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma. En una realización, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la región de bisagra comprende una secuencia de SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 105 o SEQ ID NO: 107 o SEQ ID NO: 109, o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma.

En una realización, la molécula de ácido nucleico aislada comprende, además, una secuencia que codifica un dominio co-estimulante, p. ej., un dominio co-estimulante descrito en esta memoria. En una realización, el dominio co-estimulante codificado comprende un dominio de señalización funcional de una proteína seleccionada del grupo que consiste en OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) y 4-1BB (CD137). En una realización, el dominio co-estimulante codificado comprende una secuencia de SEQ ID NO: 16. En una realización, el dominio co-estimulante codificado comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (p. ej., sustituciones), pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones (p. ej., sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de SEQ

ID NO: 16 o SEQ ID NO: 102, o una secuencia con un 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 102. En una realización, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el dominio co-estimulante comprende una secuencia de SEQ ID NO: 9 o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma.

5 La molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia que codifica un dominio de señalización intracelular, p. ej., un dominio de señalización intracelular descrito en esta memoria. En una realización, el dominio de señalización intracelular codificado comprende un dominio de señalización funcional de 4-1BB y/o un dominio de señalización funcional de CD3 zeta. En una realización, el dominio de señalización intracelular codificado comprende un dominio de señalización funcional de CD27 y/o un dominio de señalización funcional de CD3 zeta. En una realización, el dominio de señalización intracelular codificado comprende la secuencia de SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 102 y/o la secuencia de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 99. En una realización, el dominio de señalización intracelular comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (p. ej., sustituciones), pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones (p. ej., sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 y/o una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 99 o una secuencia con un 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 102 y/o una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 99. En una realización, el dominio de señalización intracelular codificado comprende la secuencia de SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 102 y la secuencia de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 99, en donde las secuencias que comprenden el dominio de señalización intracelular se expresan en el mismo marco y como una cadena polipeptídica única. En una realización, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el dominio de señalización intracelular comprende una secuencia de SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 103 o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma, y/o una secuencia de SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 100, o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma.

La molécula de ácido nucleico aislada que codifica la construcción CAR puede comprender una secuencia conductora, p. ej., una secuencia conductora descrita en esta memoria, p. ej., de SEQ ID NO: 13, una región de bisagra descrita en esta memoria, p. ej., de SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 104 o SEQ ID NO: 106 o SEQ ID NO: 108, un dominio transmembrana descrito en esta memoria, p. ej., que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 15, y un dominio de señalización intracelular, p. ej., un dominio de señalización intracelular descrito en esta memoria. En una realización, el dominio de señalización intracelular codificado comprende un dominio co-estimulante, p. ej., un dominio co-estimulante descrito en esta memoria, p. ej., un dominio co-estimulante 4-1BB que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 16, y/o un dominio de señalización primaria, p. ej., un dominio de señalización primaria descrito en esta memoria, p. ej., un dominio estimulante CD3 zeta que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 99. En una realización, el dominio de señalización intracelular codificado comprende un dominio co-estimulante, p. ej., un dominio co-estimulante descrito en esta memoria, p. ej., un dominio co-estimulante CD27 que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 102, y/o un dominio de señalización primaria, p. ej., un dominio de señalización primaria descrito en esta memoria, p. ej., un dominio estimulante CD3 zeta que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 99. En una realización, el dominio de señalización intracelular codificado comprende un dominio co-estimulante, p. ej., un dominio co-estimulante descrito en esta memoria, p. ej., un dominio co-estimulante 4-1BB que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 16, y un dominio de señalización primaria, p. ej., un dominio de señalización primaria descrito en esta memoria, p. ej., un dominio estimulante CD3 zeta que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 99. En una realización, el dominio de señalización intracelular codificado comprende un dominio co-estimulante, p. ej., un dominio co-estimulante descrito en esta memoria, p. ej., un dominio co-estimulante CD27 que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 102, y un dominio de señalización primaria, p. ej., un dominio de señalización primaria descrito en esta memoria, p. ej., un dominio estimulante CD3 zeta que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 99. En una realización, la molécula de ácido nucleico aislada que codifica la construcción CAR incluye una secuencia conductora codificada por la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 6, o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma. En una realización, la molécula de ácido nucleico aislada que codifica la construcción CAR incluye una secuencia del dominio de unión anti-EGFR codificada por la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 69 o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma. En una realización, la molécula de ácido nucleico aislada que codifica la construcción CAR incluye una secuencia de transmembrana codificada por la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 8, o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma. En una realización, la molécula de ácido nucleico aislada que codifica la construcción CAR incluye una secuencia del dominio de señalización intracelular codificada por la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 9, o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma y/o una secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 10, o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma.

55 En una realización, la molécula de ácido nucleico aislada comprende (p. ej., consiste en) un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos CAR de SEQ ID NO: 73, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, 10, 15, 20 o 30 modificaciones (p. ej., sustituciones) pero no más de 60, 50 o 40 modificaciones (p. ej., sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73, o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73

60 En una realización, la molécula de ácido nucleico aislada comprende (p. ej., consiste en) una secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 72 o una secuencia de ácidos nucleicos que tiene una identidad de 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 72.

65

En una realización, el dominio de unión anti-EGFRvIII codificado comprende una región variable de la cadena ligera en SEQ ID NO: 68 y/o una región variable de la cadena pesada en SEQ ID NO: 68. En una realización, el dominio de unión anti-EGFRvIII codificado es un scFv que comprende una cadena ligera y una cadena pesada de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68. En un aspecto de la divulgación, el dominio de unión anti-EGFRvIII (p. ej., un scFv) comprende: una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (p. ej., sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (p. ej., sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena ligera proporcionada en SEQ ID NO: 38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 u 80, o una secuencia con un 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 u 80; y/o una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (p. ej., sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (p. ej., sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena pesada proporcionada en SEQ ID NO: 38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 u 80, o una secuencia con un 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos en SEQ ID NO: 38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 u 80. En una realización, el dominio de unión anti-EGFRvIII comprende una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en SEQ ID NO: 68. En una realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de unión anti-EGFRvIII comprende una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en SEQ ID NO: 69 o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma. En un aspecto de la divulgación, el dominio de unión anti-EGFRvIII codificado es un scFv, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en esta memoria, p. ej., en la Tabla 2, está unida a una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en esta memoria, p. ej., en la Tabla 2, a través de un enlazador, p. ej., un enlazador descrito en esta memoria. En una realización, el dominio de unión anti-EGFRvIII codificado incluye un enlazador (Gly₄-Ser)_n, en donde n es 1, 2, 3, 4, 5 o 6, preferiblemente 4 (SEQ ID NO: 110). La región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada de un scFv pueden estar, p. ej., en cualquiera de las siguientes orientaciones: región variable de la cadena ligera-enlazador-región variable de la cadena pesada o región variable de la cadena pesada-enlazador-región variable de la cadena ligera.

La invención proporciona una molécula de polipéptido aislada codificada por una molécula de ácido nucleico de la invención. En una realización, el polipéptido aislado comprende una secuencia de SEQ ID NO: 73, o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma.

En esta memoria se describe una molécula de receptor de antígeno quimérico (CAR) aislada, que comprende un dominio de unión anti-EGFRvIII (p. ej., un anticuerpo humanizado o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a EGFRvIII), un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular (p. ej., un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio co-estimulante y/o un dominio de señalización primario).

Por lo tanto, la invención proporciona una molécula de receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde dicha molécula de CAR comprende un dominio de unión anti-EGFRvIII, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio de señalización primario, un dominio co-estimulante, o tanto un dominio de señalización primario como un dominio co-estimulante, en donde el dominio de unión anti-EGFRvIII codificado comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 99% de identidad de la secuencia con SEQ ID NO: 68 que comprende: (a) una región variable de inmunoglobulina de cadena pesada que comprende: (i) una CDR1 que comprende la secuencia DYYIH (SEQ ID NO: 22); (ii) una CDR2 que comprende la secuencia RIDPENDETKYGPIFQG (SEQ ID NO: 23); e (iii) una CDR3 que comprende la secuencia RGGVY (SEQ ID NO: 24); y (b) una región variable de inmunoglobulina de cadena ligera que comprende: (i) una CDR1 que comprende la secuencia KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO: 26); (ii) una CDR2 que comprende la secuencia LVSKLDS (SEQ ID NO: 27); e (iii) una CDR3 que comprende la secuencia WQGTHFPGT (SEQ ID NO: 28). En un aspecto, el CAR comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que incluye un dominio de unión anti-EGFRvIII descrito en esta memoria (p. ej., un anticuerpo humanizado o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a EGFRvIII tal como se describe en esta memoria), un dominio transmembrana descrito en esta memoria y un dominio de señalización intracelular descrito en esta memoria (p. ej., un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio co-estimulante y/o un dominio de señalización primario descrito en esta memoria).

En un aspecto de la divulgación, el dominio de unión anti-EGFRvIII comprende una región variable de la cadena ligera descrita en esta memoria (p. ej., en la Tabla 2 o SEQ ID NO: 11) y/o una región variable de la cadena pesada descrita en esta memoria (p. ej., en la Tabla 2 o SEQ ID NO: 11). En un aspecto de la divulgación, el dominio de unión anti-EGFRvIII es un scFv que comprende una cadena ligera y una cadena pesada de una secuencia de aminoácidos de la Tabla 2 o SEQ ID NO: 11. En un aspecto de la divulgación, el dominio de unión anti-EGFRvIII (p. ej., un scFv) comprende: una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (p. ej., sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (p. ej., sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena ligera proporcionada en la Tabla 2 o SEQ ID NO: 11, o una secuencia con un 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de la Tabla 2 o SEQ ID NO: 11; y/o una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (p. ej., sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (p. ej., sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena pesada proporcionada en la Tabla 2 o SEQ ID NO: 11, o una secuencia con un 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de la Tabla 2 o SEQ ID NO: 11. En un aspecto de la divulgación, el dominio de unión anti-EGFRvIII comprende una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 80 y SEQ

ID NO: 86, o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma. En un aspecto de la divulgación, el dominio de unión anti-EGFRvIII es un scFv, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en esta memoria, p. ej., en la Tabla 2 o SEQ ID NO: 11, está unida a una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en esta memoria, p. ej., en la Tabla 2 o SEQ ID NO: 11, a través de un enlazador, p. ej., un enlazador descrito en esta memoria. En una realización, el dominio de unión anti-EGFRvIII incluye un enlazador (Gly₄-Ser)_n, en donde n es 1, 2, 3, 4, 5 o 6, preferiblemente 4 (SEQ ID NO: 110). La región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada de un scFv pueden estar, p. ej., en cualquiera de las siguientes orientaciones: región variable de la cadena ligera-enlazador-región variable de la cadena pesada o región variable de la cadena pesada-enlazador-región variable de la cadena ligera.

En una realización, la molécula de CAR aislada comprende un dominio transmembrana de una proteína seleccionada del grupo que consiste en la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 y CD154. En una realización, el dominio transmembrana comprende una secuencia de SEQ ID NO: 15. En una realización, el dominio transmembrana comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (p. ej., sustituciones), pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones (p. ej., sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, o una secuencia con un 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.

En una realización, el dominio de unión anti-EGFRvIII está conectado al dominio transmembrana por una región de bisagra, p. ej., una región de bisagra descrita en esta memoria. En una realización, la región de bisagra codificada comprende SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 104 o SEQ ID NO: 106 o SEQ ID NO: 108, o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma.

En una realización, la molécula de CAR aislada comprende, además, una secuencia que codifica un dominio co-estimulante, p. ej., un dominio co-estimulante descrito en esta memoria. En una realización, el dominio co-estimulante comprende un dominio de señalización funcional de una proteína seleccionada del grupo que consiste en OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18) y 4-1BB (CD137). En una realización, el dominio co-estimulante comprende una secuencia de SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 102. En una realización, el dominio co-estimulante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (p. ej., sustituciones), pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones (p. ej., sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 102, o una secuencia con un 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 102. La molécula de CAR aislada comprende una secuencia que codifica un dominio de señalización intracelular, p. ej., un dominio de señalización intracelular descrito en esta memoria. En una realización, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización funcional de 4-1BB o CD27 y/o un dominio de señalización funcional de CD3 zeta. En una realización, el dominio de señalización intracelular comprende la secuencia de SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 102 y/o la secuencia de SEQ ID NO: 17. En una realización, el dominio de señalización intracelular comprende la secuencia de SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 102 y/o la secuencia de SEQ ID NO: 99. En una realización, el dominio de señalización intracelular comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (p. ej., sustituciones), pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones (p. ej., sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 102 y/o una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 99 o una secuencia con un 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 102 y/o una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 99. En una realización, el dominio de señalización intracelular comprende la secuencia de SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 102 y la secuencia de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 99, en donde las secuencias que comprenden el dominio de señalización intracelular se expresan en el mismo marco y como una cadena polipeptídica única.

En una realización, la molécula de CAR aislada comprende, además, una secuencia conductora, p. ej., una secuencia conductora descrita en esta memoria. En una realización, la secuencia conductora comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, o una secuencia con un 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.

La molécula de CAR aislada puede comprender una secuencia conductora, p. ej., una secuencia conductora descrita en esta memoria, p. ej., una secuencia conductora de SEQ ID NO: 13 o que tiene un 95-99% de identidad con la misma, una región de bisagra descrita en esta memoria, p. ej., una región de bisagra de SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 104 o SEQ ID NO: 106 o SEQ ID NO: 108 o que tiene un 95-99% de identidad con la misma, un dominio transmembrana, p. ej., un dominio transmembrana descrito en esta memoria, p. ej., un dominio transmembrana que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 15 o una secuencia que tiene un 95-99% de identidad con la misma, un dominio de señalización intracelular, p. ej., un dominio de señalización intracelular descrito en esta memoria (p. ej., un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio co-estimulante y/o un dominio de señalización primario). En una realización, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio co-estimulante, p. ej., un dominio co-estimulante descrito en esta memoria, p. ej., un dominio co-estimulante 4-1BB que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 16 o un dominio co-estimulante CD27 que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 102, o que tiene un 95-99% de identidad con la misma, y/o un dominio de señalización primaria, p. ej., un dominio de señalización primaria descrito en esta memoria, p. ej., un dominio estimulante CD3 zeta que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 99, o que tiene un 95-99% de identidad con la misma. En una realización, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio co-estimulante, p. ej., un dominio co-

estimulante descrito en esta memoria, p. ej., un dominio co-estimulante 4-1BB que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 16 o un dominio co-estimulante CD27 que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 102, y/o un dominio de señalización primaria, p. ej., un dominio de señalización primaria descrito en esta memoria, p. ej., un dominio estimulante CD3 zeta que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 99.

En una realización, la molécula de CAR aislada comprende (p. ej., consiste en) una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, 10, 15, 20 o 30 modificaciones (p. ej., sustituciones) pero no más de 60, 50 o 40 modificaciones (p. ej., sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73, o una secuencia de aminoácidos que tiene un 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73.

En un aspecto de la divulgación, el dominio de unión anti-EGFRvIII comprende una región variable de la cadena ligera descrita en esta memoria (p. ej., en SEQ ID NO: 38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 u 80) y/o una región variable de la cadena pesada descrita en esta memoria (p. ej., en SEQ ID NO: 38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 u 80). En una realización de la invención, el dominio de unión anti-EGFRvIII es un scFv que comprende una cadena ligera y una cadena pesada de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68. En un aspecto de la divulgación, el dominio de unión anti-EGFRvIII (p. ej., un scFv) comprende: una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (p. ej., sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (p. ej., sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena ligera proporcionada en SEQ ID NO: 38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 u 80, o una secuencia con un 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 u 80; y/o una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (p. ej., sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (p. ej., sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena pesada proporcionada en SEQ ID NO: 38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 u 80, o una secuencia con un 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos en SEQ ID NO: 38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 u 80. En una realización, el dominio de unión anti-EGFRvIII comprende la secuencia de SEQ ID NO: 68. En un aspecto de la divulgación, el dominio de unión anti-EGFRvIII es un scFv, y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en esta memoria, p. ej., en la Tabla 2, está unida a una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en esta memoria, p. ej., en la Tabla 2, a través de un enlazador, p. ej., un enlazador descrito en esta memoria. En una realización, el dominio de unión anti-EGFRvIII incluye un enlazador (Gly₄-Ser)_n, en donde n es 1, 2, 3, 4, 5 o 6, preferiblemente 4 (SEQ ID NO: 110). La región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada de un scFv pueden estar, p. ej., en cualquiera de las siguientes orientaciones: región variable de la cadena ligera-enlazador-región variable de la cadena pesada o región variable de la cadena pesada-enlazador-región variable de la cadena ligera.

Se describe en esta memoria un vector que comprende una molécula de ácido nucleico descrita en esta memoria, p. ej., una molécula de ácido nucleico que codifica un CAR descrita en esta memoria. En una realización, el vector se selecciona del grupo que consiste en un ADN, un ARN, un plásmido, un vector lentivirus, un vector adenoviral o un vector retrovirus.

Por lo tanto, la invención proporciona un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de la invención.

En una realización, el vector es un vector lentivirus. En una realización, el vector comprende, además, un promotor. En una realización, el promotor es un promotor EF-1. En una realización, el promotor EF-1 comprende una secuencia de SEQ ID NO: 97.

En una realización, el vector es un vector transcrito in vitro, p. ej., un vector que transcribe ARN de una molécula de ácido nucleico descrita en esta memoria. En una realización, la secuencia de ácido nucleico en el vector comprende, además, una cola de poli(A), p. ej., una cola de poli A descrita en esta memoria, p. ej., que comprende aproximadamente 150 bases de adenosina (SEQ ID NO: 111). En una realización, la secuencia de ácido nucleico en el vector comprende, además, un 3'UTR, p. ej., un 3'UTR descrito en esta memoria, p. ej., que comprende al menos una repetición de un 3'UTR derivado de beta-globulina humana.

La invención proporciona una célula aislada que comprende una molécula de ácido nucleico de la invención, la molécula polipeptídica aislada de la invención, el CAR de la invención o el vector de la invención. En una realización, la célula es una célula descrita en esta memoria, p. ej., una célula T humana, p. ej., una célula T humana descrita en esta memoria. En una realización, la célula T humana es una célula T CD8 +.

La invención también proporciona un método in vitro o ex vivo para hacer una célula, que comprende transducir una célula T con la molécula de ácido nucleico o el vector de la invención.

La presente invención también proporciona un método in vitro o ex vivo para generar una población de células modificadas por ARN, p. ej., células descritas en esta memoria, p. ej., células T, que expresan transitoriamente ARN exógeno. El método comprende introducir un ARN transcrito in vitro o ARN sintético en una célula, en que el ARN comprende un ácido nucleico que codifica una molécula de CAR de la invención.

La invención proporciona una célula de la invención para uso en un método para proporcionar una inmunidad anti-tumor en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una cantidad efectiva de una célula. En una realización, la célula es una célula T autóloga. En una realización, la célula es una célula T alogénica. En una realización, el mamífero es un ser humano.

La invención también proporciona una célula de la invención para uso en un método de tratar un mamífero que tiene una enfermedad asociada con la expresión de EGFRvIII (p. ej., una enfermedad proliferativa, una afección precancerosa, y una indicación no relacionada con el cáncer asociada con la expresión de EGFRvIII) que comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz de la célula.

En una realización, la enfermedad es una enfermedad descrita en esta memoria. En una realización, la enfermedad asociada con EGFRvIII es un glioblastoma. En una realización, la enfermedad asociada con EGFRvIII es un cáncer, p. ej., un cáncer seleccionado del grupo que consiste en glioblastoma multiforme (GBM), astrocitoma anaplásico, glioblastoma de células gigantes, gliosarcoma, oligodendroglioma anaplásico, ependimoma anaplásico, carcinoma del plexo corioideo, ganglioglioma anaplásico, pineoblastoma, meduloepitelioma, ependimoblastoma, meduloblastoma, tumor neuroectodérmico primitivo supratentorial, tumor teratoideo/rabdoideo atípico, cáncer de pulmón (p. ej., carcinomas de pulmón de células no pequeñas), de mama, próstata, ovario, carcinoma colorrectal y de vejiga y cualquier combinación de los mismos, y metástasis de cualquiera de los cánceres.

En un aspecto, las células que expresan una molécula de CAR, p. ej., una molécula de CAR descrita en esta memoria, se administran en combinación con un agente que aumenta la eficacia de una célula que expresa una molécula de CAR, p. ej., un agente descrito en esta memoria.

En un aspecto, células que expresan una molécula de CAR, p. ej., una molécula de CAR descrita en esta memoria, se administran en combinación con un agente que mejora uno o más efectos secundarios asociados con la administración de una célula que expresa una molécula de CAR, p. ej., un agente descrito en esta memoria.

En un aspecto, células que expresan una molécula de CAR, p. ej., una molécula de CAR descrita en esta memoria, se administran en combinación con un agente que trata la enfermedad asociada con EGFRvIII, p. ej., un agente descrito en esta memoria.

En un aspecto, células que expresan una molécula de CAR, p. ej., una molécula de CAR descrita en esta memoria, se administran a una dosis y/o un programa de dosificación descrito en esta memoria.

En un aspecto, células que expresan una molécula de CAR, p. ej., una molécula de CAR descrita en esta memoria, se administran como un tratamiento de primera línea para la enfermedad, p. ej., el cáncer, p. ej., el cáncer descrito en esta memoria. En otro aspecto, células que expresan una molécula de CAR, p. ej., una molécula de CAR descrita en esta memoria, se administran como un tratamiento de segunda, tercera y cuarta línea para la enfermedad, p. ej., el cáncer, p. ej., el cáncer descrito en esta memoria.

La invención proporciona la molécula de ácido nucleico aislada que codifica un CAR de la invención, la molécula de polipéptido aislada de un CAR de la invención, el vector que comprende un CAR de la invención y la célula que comprende un CAR de la invención para uso como un medicamento, p. ej., como se describe en esta memoria.

En una realización, la molécula de ácido nucleico aislada que codifica un CAR de la invención, la molécula de polipéptido aislada de un CAR de la invención, el vector que comprende un CAR de la invención y la célula que comprende un CAR de la invención es para uso en el tratamiento de una enfermedad que expresa EGFRvIII, p. ej., una enfermedad que expresa EGFRvIII como se describe en esta memoria.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las Figuras 1A y 1B son una serie de diagramas esquemáticos de vectores lentivirales para 3C10-CAR y miR-17-92. La Figura 1A representa el vector de expresión de 3C10-CAR pELNS-3C10-CAR; y la Figura 1B representa el vector lentiviral que expresa miR-17-92;

Las Figuras 2A a 2C son una serie de imágenes que muestran la expresión funcional de 3C10-CAR y miR-17-92 transducidos lentiviralmente en células T humanas. Células T CD3 + que se transdujeron con pELNS-3C10-CAR solas o tanto pELNS-3C10-CAR como FG12-EF1a-miR-17/92;

Las Figuras 3A a 3D son una serie de imágenes que demuestran que la co-expresión de miR17-92 en células CAR-T confiere resistencia a los efectos supresores de TGF- β y TMZ. Las células CAR-T (barras abiertas) y las co-transducidas con miR-17-92 (barras cerradas) se co-cultivaron con un EGFRvIII que expresa APCs en presencia de las concentraciones indicadas de TGF- β y TMZ;

Las Figuras 4A y 4B son imágenes que representan efectos terapéuticos robustos de células CAR-T en ratones que portan tumores U87-EGFRvIII;

Las Figuras 5A a 5C son una serie de imágenes que demuestran que miR-17-92 co-transducido en células CAR-T confiere una protección mejorada frente a las células de glioma re-desafiadas;

La Figura 6 es una imagen que muestra la comparación de los CARs EGFRvIII representativos (SEQ ID NOS 1, 121 y 2, respectivamente, en orden de aparición);

La Figura 7 es una imagen que muestra que las células T humanas transducidas con CARs EGFRvIII exhibieron una lisis específica y potente de células GBM humanas U87 que expresan EGFRvIII (U87-EGFRvIII);

La Figura 8 es un gráfico que muestra que todos los CARTs anti-EGFRvIII eliminan células tumorales, pero la construcción 3C10.BBz CART elimina los tumores más rápidamente hacia el día 7;

La Figura 9 es una tabla que muestra las secuencias VH y VL de EGFRvIII humanizado (SEQ ID NOS 122-127, respectivamente, en orden de aparición);

La Figura 10 es un gráfico que muestra la unión in vitro de construcciones scFv humanizadas solubles que se unen a la línea celular EGFRvIII +;

La Figura 11 es un gráfico que muestra la unión in vitro de construcciones scFv humanizadas solubles que se unen a la línea celular de tipo salvaje EGFR, con el clon 73 (al que también se alude como CAR6) y el clon 74 (al que también se alude como CAR7) que muestra un perfil más seguro;

La Figura 12 es un gráfico de comparación de la especificidad de CAR9 murino y CAR10 humano para EGFRvIII y EGFR de tipo salvaje en la transfección transitoria de células Jurkat y detección con proteínas de fusión Fc;

La Figura 13 es un gráfico que muestra la transducción de células T primarias de células T donantes con las construcciones CAR EGFRvIII humanizadas mCAR19 (control), CAR10, CAR9 y CAR6, teñidas con cantidades saturantes de EGFRvIII;

La Figura 14 es un gráfico que muestra la actividad de luciferasa de construcciones CAR EGFRvIII humanizadas por BHK-EGFRvIII, pero no por células de tipo salvaje;

La Figura 15 es un gráfico que muestra que las construcciones CAR EGFRvIII humanizadas proliferan en respuesta al desafío de U87vIII sin proliferación de fondo a EGFR de tipo salvaje;

La Figura 16 es un gráfico que muestra que las construcciones CAR EGFRvIII humanizadas proliferan in vitro en presencia de un desafío U87vIII;

La Figura 17 es un gráfico que muestra un ensayo de destrucción del tumor de liberación de cromo 51 a las 4 horas en el que la construcción EGFRvIII CAR humanizada, 2173 (CAR6) y CAR9 mata específicamente células EGFR que expresan EGFRvIII pero no de tipo salvaje; y

La Figura 18 es un gráfico que muestra la progresión del tamaño del tumor (cm³, panel superior izquierdo) y la progresión del promedio de radiación tumoral (p/s/cm²/sr, panel superior derecho), y la curva de supervivencia de Kaplan-meier (inferior) in vivo en ratones tratados con células T CAR+ transducidas con la construcción humanizada CAR EGFRvIII (CAR6).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todas las expresiones y los términos técnicos y científicos utilizados en esta memoria tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece la invención.

El término "un" y "una" se refiere a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

El término "aproximadamente", cuando se refiere a un valor mensurable tal como una cantidad, una duración temporal y similares, pretende abarcar variaciones de $\pm 20\%$ o en algunos casos $\pm 10\%$, o en algunos casos $\pm 5\%$, o en algunos casos $\pm 1\%$, o en algunos casos $\pm 0,1\%$ del valor especificado, ya que variaciones de este tipo son apropiadas para realizar los métodos descritos.

La expresión "Receptor de Antígeno Quimérico" o, alternativamente, un "CAR" se refiere a una construcción de polipéptido recombinante que comprende al menos un dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización citoplasmática (al que también se alude en esta memoria como "un dominio de señalización intracelular") que comprende un dominio de señalización funcional derivado de una molécula estimulante tal como se define más adelante. En un aspecto, la molécula estimulante es la cadena zeta asociada con el complejo receptor de células T. En un aspecto, el dominio de señalización citoplasmática comprende, además, uno o más dominios de señalización funcionales derivados de al menos una molécula co-estimulante tal como se define más adelante. En un aspecto, la molécula co-estimulante se elige entre 4-1BB (es decir, CD137) y/o CD28. En un aspecto el CAR comprende una proteína de fusión quimérica que comprende un dominio de reconocimiento de antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio de señalización funcional derivado de una molécula estimulante. En un aspecto, el CAR comprende una proteína de fusión quimérica que comprende un dominio de reconocimiento de antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio de señalización funcional derivado de una molécula co-estimulante y un dominio de señalización funcional derivado de una molécula estimulante. En un aspecto, el CAR comprende una proteína de fusión quimérica que comprende un dominio de reconocimiento de antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende dos dominios de señalización funcionales derivados de una o más moléculas co-estimulantes y un dominio de señalización funcional derivado de una molécula estimulante. En un aspecto, el CAR comprende una proteína de fusión quimérica que comprende un dominio de reconocimiento de antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende al menos dos dominios de señalización funcionales derivados de una o más moléculas co-estimulantes y un dominio de señalización funcional derivado de una molécula estimulante. En un aspecto, el CAR comprende una secuencia conductora opcional en el extremo amino (N-ter) de la proteína de fusión CAR. En un aspecto, el CAR comprende además una secuencia conductora en el extremo N del dominio de reconocimiento de antígeno extracelular, en donde la secuencia conductora está opcionalmente escindida del dominio de reconocimiento de antígeno (p. ej., un scFv) durante el procesamiento celular y la localización del CAR en la membrana celular.

La expresión "dominio de señalización" se refiere a la porción funcional de una proteína que actúa transmitiendo información dentro de la célula para regular la actividad celular a través de rutas de señalización definidas generando segundos mensajeros o funcionando como efectores respondiendo a dichos mensajeros.

El término "EGFR" se refiere a cualquier receptor de factor de crecimiento epidérmico de longitud completa maduro de mamífero, que incluye formas humanas y no humanas. El EGFR humano de 1186 aminoácidos se describe en Ullrich et al., *Nature* 309:418-425 (1984)) y GenBank N.º de Acceso AF125253 y SwissProt N.º Acc P00533-2.

El término "EGFRvIII" se refiere a la variante III del receptor del factor de crecimiento Epidérmico. EGFRvIII es la variante más común de EGFR observada en tumores humanos, pero rara vez se observa en tejido normal. Esta proteína resulta de la delección en el marco de los exones 2-7 y la generación de un nuevo residuo de glicina en la unión de los exones 1 y 8 dentro del dominio extracelular del EGFR, creando con ello un epítipo específico para el tumor. EGFRvIII se expresa en un 24% a 67% de GBM, pero no en tejidos normales. EGFRvIII también se conoce como mutante tipo III, delta-EGFR, EGFR Δ 2-7 y Δ EGFR y se describe en las patentes de EE. UU. N.ºs 6.455.498, 6.127.126, 5.981.725, 5.814.317, 5.710.010, 5.401.828 y 5.212.290. La expresión de EGFRvIII puede ser el resultado de una delección cromosómica, y también puede ser el resultado de un corte y empalme alternativo aberrante. Véase Sugawa et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:8602-8606.

El término "anticuerpo", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una proteína o secuencia polipeptídica derivada de una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente con un antígeno. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales, de cadena múltiple o simple, o inmunoglobulinas intactas, y pueden derivarse de fuentes naturales o de fuentes recombinantes. Los anticuerpos pueden ser tetrámeros de moléculas de inmunoglobulina.

La expresión "fragmento de anticuerpo" se refiere a al menos una porción de un anticuerpo intacto, o variantes recombinantes del mismo, y se refiere al dominio de unión a antígeno, p. ej., una región variable determinante antigénica de un anticuerpo intacto, que es suficiente para conferir reconocimiento y unión específica del fragmento de anticuerpo a una diana, tal como un antígeno. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, fragmentos de anticuerpos scFv, anticuerpos lineales, anticuerpos de dominio único tales como sdAb (ya sea VL o VH), dominios VHH de camélidos y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. El término "scFv" se refiere a una proteína de fusión que comprende al menos un fragmento de anticuerpo que comprende una región variable de una cadena ligera y al menos un fragmento de anticuerpo que comprende una región variable de una cadena pesada, en donde las regiones variables de la cadena ligera y pesada están unidas contiguamente a través de un enlazador de polipéptido flexible corto, y capaz de expresarse como una sola cadena polipeptídica, y en donde la scFv retiene la especificidad del anticuerpo intacto del cual se deriva. A menos que se especifique, tal como se utiliza en esta memoria, una scFv puede tener las regiones variables VL y VH en cualquier orden, p. ej., con respecto a los extremos N-terminal y C-terminal del polipéptido, la scFv puede comprender VL-enlazador-VH o puede comprender VH-enlazador-VL.

- La porción de la composición de CAR de la invención que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo puede existir en una diversidad de formas en las que el dominio de unión al antígeno se expresa como parte de una cadena polipeptídica contigua que incluye, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo de dominio único (sdAb), un anticuerpo de cadena sencilla (scFv) y un anticuerpo humanizado (Harlow et al., 1999, En: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, En: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426). En un aspecto, el dominio de unión a antígeno de una composición de CAR de la invención comprende un fragmento de anticuerpo. En un aspecto adicional, el CAR comprende un fragmento de anticuerpo que comprende un scFv.
- La expresión "cadena pesada de anticuerpos" se refiere al mayor de los dos tipos de cadenas polipeptídicas presentes en moléculas de anticuerpos en sus conformaciones que se producen de forma natural y que normalmente determina la clase a la que pertenece el anticuerpo.
- La expresión "cadena ligera de anticuerpos" se refiere al menor de los dos tipos de cadenas polipeptídicas presentes en moléculas de anticuerpos en sus conformaciones que se producen de forma natural. Las cadenas ligeras kappa (κ) y lambda (λ) se refieren a los dos isotipos principales de la cadena ligera de anticuerpo.
- La expresión "anticuerpo recombinante" se refiere a un anticuerpo que se genera utilizando tecnología de ADN recombinante, tal como, por ejemplo, un anticuerpo expresado por un bacteriófago o un sistema de expresión de levaduras. La expresión también debe interpretarse como un anticuerpo que ha sido generado por la síntesis de una molécula de ADN que codifica el anticuerpo y molécula de ADN que expresa una proteína de anticuerpo, o una secuencia de aminoácidos que especifica el anticuerpo, en donde la secuencia de ADN o de aminoácidos se ha obtenido utilizando ADN recombinante o tecnología de secuencia de aminoácidos que está disponible y es bien conocida en la técnica.
- El término "antígeno" o "Ag", tal como se utiliza en esta memoria, se define como una molécula que provoca una respuesta inmune. Esta respuesta inmune puede implicar la producción de anticuerpos o la activación de células inmunológicamente competentes específicas, o ambas. El experto en la técnica entenderá que cualquier macromolécula, incluidas virtualmente todas las proteínas o péptidos, puede servir como un antígeno. Además, los antígenos pueden derivarse de ADN recombinante o genómico. Un experto entenderá que cualquier ADN, que comprende una secuencia de nucleótidos o una secuencia de nucleótidos parcial que codifica una proteína que provoca una respuesta inmune, codifica, por lo tanto, un "antígeno" tal como ese término se utiliza en esta memoria. Además, un experto en la técnica comprenderá que un antígeno no necesita ser codificado únicamente por una secuencia de nucleótidos de longitud completa de un gen. Es fácilmente evidente que la presente invención incluye, pero no se limita al uso de secuencias de nucleótidos parciales de más de un gen y que estas secuencias de nucleótidos están dispuestas en diversas combinaciones para codificar polipéptidos que provocan la respuesta inmune deseada. Además, un experto en la técnica comprenderá que un antígeno no necesita ser codificado por un "gen" en absoluto. Es fácilmente evidente que un antígeno puede generarse sintetizado o derivarse de una muestra biológica, o podría ser una macromolécula además de un polipéptido. Una muestra biológica de este tipo puede incluir, pero no se limita a una muestra de tejido, una muestra tumoral, una célula o un fluido con otros componentes biológicos.
- La expresión "efecto antitumoral" se refiere a un efecto biológico que puede manifestarse por diversos medios, que incluyen, pero no se limitan a, p. ej., una disminución en el volumen del tumor, una disminución en el número de células tumorales, una disminución en el número de metástasis, un aumento en la esperanza de vida, una disminución en la proliferación de células tumorales, una disminución en la supervivencia de células tumorales o una mejora de diversos síntomas fisiológicos asociados con la afección cancerosa. Un "efecto antitumoral" también puede manifestarse por la capacidad de los péptidos, polinucleótidos, células y anticuerpos descritos en esta memoria en la prevención de la aparición de tumores en primer lugar.
- El término "autólogo" se refiere a cualquier material derivado del mismo individuo al que luego se re-introducirá en el individuo.
- El término "alogénico" se refiere a cualquier material derivado de un animal diferente de la misma especie que el individuo en el que se introduce el material. Se dice que dos o más individuos son alogénicos entre sí cuando los genes en uno o más loci no son idénticos. En algunos aspectos, el material alogénico de individuos de la misma especie puede ser suficientemente genéticamente diferente para interactuar antigénicamente.
- El término "xenogénico" se refiere a un injerto derivado de un animal de una especie diferente.
- El término "cáncer" se refiere a una enfermedad caracterizada por el crecimiento rápido e incontrolado de células aberrantes. Las células cancerosas pueden diseminarse localmente o a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático a otras partes del cuerpo. En esta memoria se describen ejemplos de diversos cánceres e incluyen, pero no se limitan a glioblastoma, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de piel, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer de cerebro, linfoma, leucemia, cáncer de pulmón y similares.

La expresión "enfermedad asociada con la expresión de EGFRvIII", tal como se utiliza en esta memoria, incluye, pero no se limita a, una enfermedad asociada con la expresión de EGFRvIII o afección asociada con células que expresan EGFRvIII, incluyendo células tumorales de diversos cánceres, tales como, p. ej., glioblastoma (incluidas las células madre de glioblastoma); carcinomas de mama, de ovario y de pulmón de células no pequeñas; carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello; meduloblastoma, cáncer colorrectal, cáncer de próstata y carcinoma de vejiga. Sin desear estar ligados a una teoría o mecanismo particular, se cree que al provocar una respuesta específica para antígeno contra EGFRvIII, los CARs descritos en esta memoria proporcionan una o más de las siguientes: fijan como objetivo y destruyen células tumorales que expresan EGFRvIII, reduciendo o eliminando tumores, facilitando la infiltración de células inmunes en el sitio del tumor y potenciando/extendiendo las respuestas antitumorales. Debido a que EGFRvIII no se expresa a niveles detectables en tejido normal (es decir, no canceroso), se contempla que los CARs de la invención eviten ventajosamente de manera sustancial fijar como objetivo/destruir tejidos y células normales.

La expresión "modificaciones de secuencia conservativas" pretende dar a entender modificaciones de aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Modificaciones conservativas de este tipo incluyen sustituciones, adiciones y deleciones de aminoácidos. Se pueden introducir modificaciones en un anticuerpo o fragmento de anticuerpo descrito en esta memoria mediante técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Sustituciones conservativas de aminoácidos son unas en las que el residuo aminoácido se reemplaza por un residuo aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido las familias de residuos aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales de carácter básico (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales de carácter ácido (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (p. ej., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales con ramificaciones beta (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, uno o más residuos aminoácidos dentro de un CAR de la invención pueden reemplazarse por otros residuos aminoácidos de la misma familia de cadenas laterales y el CAR alterado puede analizarse utilizando los ensayos funcionales descritos en esta memoria.

El término "estimulación" se refiere a una respuesta primaria inducida por la unión de una molécula estimulante (p. ej., un complejo TCR/CD3) con su ligando afín mediando con ello en un evento de transducción de señales, tal como, pero no limitado a, transducción de señales a través del complejo TCR/CD3. La estimulación puede mediar en la expresión alterada de determinadas moléculas, tales como regulación descendente de TGF- β , y/o reorganización de estructuras citoesqueléticas, y similares.

La expresión "molécula estimulante" se refiere a una molécula expresada por una célula T que proporciona la o las secuencias de señalización citoplasmática primaria que regulan la activación primaria del complejo TCR de manera estimulante para al menos algún aspecto de la vía de señalización de células T. En un aspecto, la señal primaria se inicia, por ejemplo, mediante la unión de un complejo TCR/CD3 con una molécula de MHC cargada con péptido, y que conduce a la mediación de una respuesta de células T, que incluye, pero no se limita a proliferación, activación, diferenciación y similares. Una secuencia de señalización citoplasmática primaria (a la que también se alude como "dominio de señalización primaria") que actúa de manera estimulante puede contener un motivo de señalización que se conoce como motivo de activación inmunorreceptor basado en tirosina o ITAM. Ejemplos de una secuencia de señalización citoplasmática primaria que contiene ITAM que es de uso particular en la invención incluyen, pero no se limitan a, aquellas derivadas de TCR zeta, FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 (también conocido como "ICOS") y CD66d. En un CAR específico de la invención, el dominio de señalización intracelular en uno o más CARS de la invención comprende una secuencia de señalización intracelular, p. ej., una secuencia de señalización primaria de CD3-zeta. En un CAR específico de la invención, la secuencia de señalización primaria de CD3-zeta es la secuencia proporcionada como SEQ ID NO: 17 o los residuos equivalentes de una especie no humana, p. ej., ratón, roedor, mono, simio y similares. En un CAR específico de la invención, la secuencia de señalización primaria de CD3-zeta es la secuencia proporcionada como SEQ ID NO: 99 o los residuos equivalentes de una especie no humana, p. ej., ratón, roedor, mono, simio y similares.

La expresión "célula presentadora de antígeno" o "APC" se refiere a una célula del sistema inmune tal como una célula accesoria (p. ej., una célula B, una célula dendrítica y similares) que muestra un antígeno extraño complejo con complejos mayores de histocompatibilidad (MHC) en su superficie. Las células T pueden reconocer estos complejos utilizando sus receptores de células T (TCRs). Las APCs procesan antígenos y los presentan a células T.

Un "dominio de señalización intracelular", tal como se usa la expresión en esta memoria, se refiere a una porción intracelular de una molécula. El dominio de señalización intracelular genera una señal que fomenta una función efectora inmune de la célula que contiene CAR, p. ej., una célula CART. Ejemplos de la función efectora inmune, p. ej., en una célula CART, incluyen actividad citolítica y actividad auxiliar, incluida la secreción de citoquinas.

En una realización, el dominio de señalización intracelular puede comprender un dominio de señalización intracelular primario. Dominios de señalización intracelular primaria a modo de ejemplo incluyen los derivados de las moléculas responsables de la estimulación primaria, o la simulación dependiente de antígeno. En una realización, el dominio de

señalización intracelular puede comprender un dominio intracelular co-estimulante. Dominios de señalización intracelular co-estimulantes a modo de ejemplo incluyen los derivados de las moléculas responsables de las señales co-estimulantes, o la simulación dependiente de antígeno. Por ejemplo, en el caso de un CART, un dominio de señalización intracelular primaria puede comprender una secuencia citoplasmática de un receptor de células T, y un dominio de señalización intracelular co-estimulante puede comprender una secuencia citoplasmática de molécula co-receptora o co-estimulante.

Un dominio de señalización intracelular primaria puede comprender un motivo de señalización que se conoce como un motivo de activación inmunorreceptor basado en tirosina o ITAM. Ejemplos de secuencias de señalización citoplasmática primaria que contiene ITAM incluyen, pero no se limitan a, aquellas derivadas de CD3 zeta, FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b, y CD66d DAP10 y DAP12.

El término "zeta" o, alternativamente, "cadena zeta", "CD3-zeta" o "TCR-zeta" se define como la proteína proporcionada como GenBank N° Acc. BAG36664.1, o los residuos equivalentes de una especie no humana, p. ej., ratón, roedor, mono, simio y similares, y un "dominio estimulante zeta" o, alternativamente, un "dominio estimulante CD3-zeta" o un "dominio estimulante de TCR-zeta" se define como los residuos aminoácidos del dominio citoplasmático de la cadena zeta que son suficientes para transmitir funcionalmente una señal inicial necesaria para la activación de las células T. En un aspecto, el dominio citoplasmático de zeta comprende los residuos 52 a 164 de GenBank N° Acc. BAG36664.1 o los residuos equivalentes de una especie no humana, p. ej., ratón, roedor, mono, simio y similares, que son ortólogos funcionales de los mismos. En un aspecto, el "dominio de estimulación zeta" o un "dominio de estimulación CD3-zeta" es la secuencia proporcionada como SEQ ID NO: 17. En un aspecto, el "dominio de estimulación zeta" o un "dominio de estimulación CD3-zeta" es la secuencia proporcionada como SEQ ID NO: 99.

La expresión "molécula co-estimulante" se refiere al participante en la unión afín en una célula T que se une específicamente con un ligando co-estimulante, mediando con ello en una respuesta co-estimulante por la célula T, tal como, pero no limitado a proliferación. Las moléculas co-estimulantes son moléculas de la superficie celular distintas de los receptores de antígeno o sus ligandos que se requieren para una respuesta inmune eficiente. Moléculas co-estimulantes incluyen, pero no se limitan a una molécula de MHC de clase I, BTLA y un receptor de ligando Toll, así como OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18) y 4-1BB (CD137).

Un dominio de señalización intracelular co-estimulante puede derivarse de la porción intracelular de una molécula co-estimulante. Una molécula co-estimulante puede representarse en las siguientes familias de proteínas: proteínas receptoras de TNF, proteínas de tipo inmunoglobulina, receptores de citoquinas, integrinas, moléculas de activación linfocítica de señalización (proteínas SLAM) y receptores de células NK activantes. Ejemplos de moléculas de este tipo incluyen CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, GITR, CD30, CD40, ICOS, BAFFR, HVEM, antígeno asociado a la función linfocítica-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3, y un ligando que se une específicamente con CD83, y similares.

El dominio de señalización intracelular puede comprender la porción intracelular completa, o el dominio de señalización intracelular nativo completo, de la molécula de la que se deriva, o un fragmento funcional de la misma.

El término "4-1BB" se refiere al miembro de la superfamilia TNFR con una secuencia de aminoácidos proporcionada como GenBank N° Acc. AAA62478.2, o los residuos equivalentes de una especie no humana, p. ej., ratón, roedor, mono, simio y similares; y un "dominio co-estimulante 4-1BB" se define como los residuos aminoácidos 214-255 de GenBank N° Acc. AAA62478.2, o los residuos equivalentes de una especie no humana, p. ej., ratón, roedor, mono, simio y similares. En un aspecto, el "dominio de co-estimulación 4-1BB" es la secuencia proporcionada como SEQ ID NO: 16 o los residuos equivalentes de una especie no humana, p. ej., ratón, roedor, mono, simio y similares.

El término "codificante" se refiere a la propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, tal como un gen, un ADNc o un ARNm, para servir como moldes para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen una secuencia definida de nucleótidos (p. ej., ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia definida de aminoácidos y las propiedades biológicas resultantes de los mismos. Por lo tanto, un gen, ADNc o ARN codifica una proteína si la transcripción y traducción del ARNm correspondiente a ese gen produce la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto a la cadena codificante, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de ARNm y generalmente se proporciona en listados de secuencias, como a la cadena no codificante, utilizada como molde para la transcripción de un gen o ADNc, se la puede aludir como codificante de la proteína u otro producto de ese gen o ADNc.

A menos que se especifique lo contrario, una "secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. La expresión secuencia de nucleótidos que codifica una proteína o un ARN también puede incluir intrones en la medida en que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína puede contener, en alguna versión, uno o más intrones.

La expresión "cantidad efectiva" o "cantidad terapéuticamente efectiva" se utiliza indistintamente en esta memoria, y se refiere a una cantidad de un compuesto, formulación, material o composición, tal como se describe en esta memoria, eficaz para lograr un resultado biológico particular.

El término "endógeno" se refiere a cualquier material de o producido dentro de un organismo, célula, tejido o sistema.

El término "exógeno" se refiere a cualquier material introducido de o producido fuera de un organismo, célula, tejido o sistema.

El término "expresión" se refiere a la transcripción y/o traducción de una secuencia de nucleótidos particular impulsada por un promotor.

La expresión "vector de transferencia" se refiere a una composición de materia que comprende un ácido nucleico aislado y que puede utilizarse para administrar el ácido nucleico aislado al interior de una célula. Se conocen numerosos vectores en la técnica que incluyen, pero no se limitan a polinucleótidos lineales, polinucleótidos asociados con compuestos iónicos o anfifílicos, plásmidos y virus. Por lo tanto, la expresión "vector de transferencia" incluye un plásmido o un virus que se replica de forma autónoma. La expresión también debe interpretarse para incluir, además, compuestos no plasmídicos y no virales que facilitan la transferencia de ácido nucleico a las células, tales como, por ejemplo, un compuesto de polilisina, liposoma y similares. Ejemplos de vectores de transferencia virales incluyen, pero no se limitan a vectores adenovirales, vectores de virus adeno-asociados, vectores retrovirales, vectores lentivirales y similares.

La expresión "vector de expresión" se refiere a un vector que comprende un polinucleótido recombinante que comprende secuencias de control de la expresión enlazadas operativamente a una secuencia de nucleótidos a expresar. Un vector de expresión comprende suficientes elementos de acción cis para la expresión; la célula huésped puede suministrar otros elementos para la expresión o en un sistema de expresión in vitro. Vectores de expresión incluyen todos los conocidos en la técnica, incluidos los cósmidos, plásmidos (p. ej., desnudos o contenidos en liposomas) y virus (p. ej., lentivirus, retrovirus, adenovirus y virus adeno-asociados) que incorporan el polinucleótido recombinante.

El término "lentivirus" se refiere a un género de la familia Retroviridae. Los lentivirus son únicos entre los retrovirus al poder infectar células que no se dividen; pueden suministrar una cantidad significativa de información genética en el ADN de la célula huésped, por lo que son uno de los métodos más eficientes de un vector de suministro de genes. El VIH, SIV y FIV son ejemplos de lentivirus.

La expresión "vector lentiviral" se refiere a un vector derivado de al menos una porción de un genoma de lentivirus, que incluye especialmente un vector lentiviral auto-inactivante como se proporciona en Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009). Otros ejemplos de vectores de lentivirus que pueden utilizarse en la clínica incluyen, pero no se limitan a, p. ej., la tecnología de administración de genes LENTIVECTOR® de Oxford BioMedica, el sistema de vectores LENTIMAX™ de Lentigen y similares. Tipos no clínicos de vectores lentivirales también están disponibles y los conoce un experto en la técnica.

El término "homólogo" o "identidad", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a la identidad de la secuencia de subunidades entre dos moléculas poliméricas, p. ej., entre dos moléculas de ácido nucleico, tales como dos moléculas de ADN o dos moléculas de ARN, o entre dos moléculas de polipéptidos. Cuando una posición de subunidad en las dos moléculas está ocupada por la misma subunidad monomérica; p. ej., si una posición en cada una de las dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, entonces son homólogas o idénticas en esa posición. La homología entre dos secuencias es una función directa del número de posiciones coincidentes u homólogas; p. ej., si la mitad (p. ej., cinco posiciones en un polímero de diez subunidades de longitud) de las posiciones en dos secuencias son homólogas, las dos secuencias son un 50% homólogas; si el 90% de las posiciones (p. ej., 9 de 10) son coincidentes u homólogas, las dos secuencias son un 90% homólogas.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (p. ej., murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de anticuerpos que se unen a antígeno) que contienen una secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados y sus fragmentos de anticuerpos son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo o fragmento de anticuerpo receptor) en los que los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor están reemplazados por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como el ratón, la rata o el conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región marco Fv (FR) de la inmunoglobulina humana están reemplazados por residuos no humanos correspondientes. Además, anticuerpos/fragmento de anticuerpo humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias CDR o marco importadas. Estas modificaciones pueden refinar y optimizar adicionalmente el comportamiento de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado o el fragmento de anticuerpo del mismo comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos dominios variables, en el o en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o una parte significativa de las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al., Nature, 321: 522-525, 1986; Reichmann et al., Nature, 332: 323-329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596, 1992.

La expresión anticuerpo "humano" se refiere a anticuerpos completamente humanos, así como a anticuerpos humanos de manera efectiva. "Completamente humano" se refiere a una inmunoglobulina, tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, en que la molécula completa es de origen humano o consiste en una secuencia de aminoácidos idéntica a una forma humana del anticuerpo o inmunoglobulina. Un anticuerpo "efectivamente humano" es un anticuerpo que incluye un número suficiente de posiciones de aminoácidos humanos, de manera que el anticuerpo no provoca una respuesta inmunogénica en un ser humano normal.

El término "aislado" significa alterado o eliminado del estado natural. Por ejemplo, un ácido nucleico o un péptido presente de forma natural en un animal vivo no está "aislado", pero el mismo ácido nucleico o péptido separado parcial o completamente de los materiales co-existentes de su estado natural está "aislado". Un ácido nucleico o proteína aislado puede existir en una forma sustancialmente purificada, o puede existir en un entorno no nativo, tal como, por ejemplo, una célula huésped.

En el contexto de la presente invención, se utilizan las siguientes abreviaturas para las bases de ácidos nucleicos que se producen comúnmente. "A" se refiere a adenosina, "C" se refiere a citosina, "G" se refiere a guanosina, "T" se refiere a timidina y "U" se refiere a uridina.

La expresión "operativamente unida" o "control transcripcional" se refiere al enlace funcional entre una secuencia reguladora y una secuencia de ácido nucleico heterólogo que da como resultado la expresión de este último. Por ejemplo, una primera secuencia de ácido nucleico está operativamente enlazada con una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico se coloca en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor está operativamente enlazado a una secuencia codificante si el promotor afecta a la transcripción o expresión de la secuencia codificante. Las secuencias de ADN enlazadas operativamente pueden ser contiguas entre sí y, p. ej., cuando sea necesario unir dos regiones codificantes de proteínas, están en el mismo marco de lectura.

La expresión administración "parenteral" de una composición inmunogénica incluye, p. ej., inyección subcutánea (s.c.), intravenosa (i.v.), intramuscular (i.m.) o intraesternal, intratumoral o técnicas de infusión.

La expresión "ácido nucleico" o el término "polinucleótido" se refiere a ácidos desoxirribonucleicos (ADN) o ácidos ribonucleicos (ARN) y sus polímeros en forma de cadena sencilla o de doble cadena. A menos que se limite de forma específica, la expresión engloba ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen unas propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y que se metabolizan de manera similar a la de los nucleótidos de origen natural. A menos que se indique lo contrario, una secuencia particular de ácidos nucleicos también abarca implícitamente variantes modificadas de forma conservativa de la misma (p. ej., sustituciones de codones degenerados), alelos, ortólogos, SNPs y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente. Específicamente, sustituciones de codones degenerados se pueden conseguir generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todas) está sustituida con una base mixta y/o residuos desoxiinosina (Batzner et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); y Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)).

Los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" se utilizan indistintamente y se refieren a un compuesto que comprende residuos aminoácidos unidos de forma covalente por enlaces peptídicos. Una proteína o un péptido debe contener al menos dos aminoácidos, y no se limita el número máximo de aminoácidos que pueden comprender una secuencia de proteína o péptido. Polipéptidos incluyen cualquier péptido o proteína que comprende dos o más aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. Tal como se utiliza en esta memoria, el término se refiere tanto a cadenas cortas, a las que también se alude comúnmente en la técnica como péptidos, oligopéptidos y oligómeros, por ejemplo, como a cadenas largas, a las que generalmente se alude en la técnica como proteínas, de las cuales existen muchos tipos. "Polipéptidos" incluyen, por ejemplo, fragmentos biológicamente activos, polipéptidos sustancialmente homólogos, oligopéptidos, homodímeros, heterodímeros, variantes de polipéptidos, polipéptidos modificados, derivados, análogos, proteínas de fusión, entre otros. Un polipéptido incluye un péptido natural, un péptido recombinante o una combinación de los mismos.

El término "promotor" se refiere a una secuencia de ADN reconocida por la maquinaria sintética de la célula, o maquinaria sintética introducida, requerida para iniciar la transcripción específica de una secuencia de polinucleótidos.

La expresión "secuencia promotora/reguladora" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que se requiere para la expresión de un producto génico enlazado operativamente a la secuencia promotora/reguladora. En algunos casos, esta secuencia puede ser la secuencia del promotor central y en otros casos, esta secuencia también puede incluir una secuencia potenciadora y otros elementos reguladores que se requieren para la expresión del producto génico. La secuencia promotora/reguladora puede ser, por ejemplo, una que exprese el producto génico de una manera específica para el tejido.

La expresión "promotor constitutivo" se refiere a una secuencia de nucleótidos que, cuando está operativamente enlazada con un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, provoca que el producto génico se produzca en una célula bajo la mayoría o todas las condiciones fisiológicas de la célula.

La expresión "promotor inducible" se refiere a una secuencia de nucleótidos que, cuando está operativamente enlazada con un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, provoca que el producto génico se produzca en una célula sustancialmente solo cuando un inductor que corresponde al promotor está presente en la célula.

5 La expresión "promotor específico para el tejido" se refiere a una secuencia de nucleótidos que, cuando está operativamente enlazada con un polinucleótido que codifica o es especificada por un gen, provoca que el producto génico se produzca en una célula sustancialmente solo si la célula es una célula del tipo de tejido correspondiente al promotor.

10 La expresión "enlazador de polipéptidos flexible" o "enlazador", tal como se utiliza en el contexto de un scFv, se refiere a un enlazador peptídico que consiste en aminoácidos tales como residuos de glicina y/o serina utilizados solos o en combinación, para enlazar regiones de cadena pesada variables y regiones de cadena ligera variables. En una realización, el enlazador de polipéptidos flexible es un enlazador Gly/Ser y comprende la secuencia de aminoácidos (Gly-Gly-Gly-Ser)_n (SEQ ID NO: 112), en que n es un número entero positivo igual a o mayor que 1. Por ejemplo, n=1, n=2, n=3, n=4, n=5 y n=6, n=7, n=8, n=9 y n=10. En una realización, los enlazadores de polipéptidos flexibles incluyen, pero no se limitan a, (Gly4 Ser) 4 (SEQ ID NO: 113) o (Gly4 Ser) 3 (SEQ ID NO: 114). En otra realización, los enlazadores incluyen múltiples repeticiones de (Gly2Ser), (GlySer) o (Gly3Ser) (SEQ ID NO: 112). También se incluyen dentro del alcance de la invención enlazadores descritos en el documento WO2012/138475.

20 Tal como se utiliza en esta memoria, un remate 5' (también denominado un remate de ARN, un remate de ARN 7-metilguanosina o un remate de ARN m⁷G) es un nucleótido de guanina modificado que ha sido añadido al extremo "frontal" o 5' de un ARN mensajero eucariota poco después del inicio de la transcripción. El remate 5' consiste en un grupo terminal que está enlazado al primer nucleótido transcrito. Su presencia es crítica para el reconocimiento por parte del ribosoma y la protección contra las RNasas. La adición del remate está acoplada a la transcripción, y se produce co-transcripcionalmente, de modo que cada uno influye en el otro. En síntesis, después del comienzo de la transcripción, el extremo 5' del ARNm que está siendo sintetizado está unido por un complejo de síntesis del remate asociado con la ARN polimerasa. Este complejo enzimático cataliza las reacciones químicas que se requieren para el rematado de ARNm. La síntesis prosigue como una reacción bioquímica multi-etapa. El resto del remate puede modificarse para modular la funcionalidad del ARNm tal como su estabilidad o eficiencia de traducción.

30 Tal como se utiliza en esta memoria, "ARN transcrito in vitro" se refiere a ARN, preferiblemente ARNm, que ha sido sintetizado in vitro. Generalmente, el ARN transcrito in vitro se genera a partir de un vector de transcripción in vitro. El vector de transcripción in vitro comprende un molde que se utiliza para generar el ARN transcrito in vitro.

35 Tal como se utiliza en esta memoria, un "poli(A)" es una serie de adenosinas unidas por poliadenilación al ARNm. En la realización preferida de una construcción para la expresión transitoria, el poliA está entre 50 y 5000 (SEQ ID NO: 115), preferiblemente más de 64, más preferiblemente más de 100, lo más preferiblemente más de 300 o 400. secuencias de poli(A) puede modificarse química o enzimáticamente para modular la funcionalidad del ARNm, tal como la localización, la estabilidad o la eficiencia de la traducción.

40 Tal como se utiliza en esta memoria, "poliadenilación" se refiere al enlace covalente de un resto poliadenilo, o su variante modificada, a una molécula de ARN mensajero. En los organismos eucariotas, la mayoría de las moléculas de ARN mensajero (ARNm) están poliadeniladas en el extremo 3'. La cola 3' poli(A) es una secuencia larga de nucleótidos de adenina (a menudo varios cientos) añadidos al pre-ARNm mediante la acción de una enzima, poliadenilato polimerasa. En eucariotas superiores, la cola poli(A) se añade a transcripciones que contienen una secuencia específica, la señal de poliadenilación. La cola poli(A) y la proteína unida a ella ayudan a proteger el ARNm de la degradación por parte de exonucleasas. La poliadenilación también es importante para la terminación de la transcripción, la exportación del ARNm desde el núcleo y la traducción. La poliadenilación ocurre en el núcleo inmediatamente después de la transcripción de ADN en ARN, pero también puede ocurrir más tarde en el citoplasma. Después de finalizar la transcripción, la cadena de ARNm se escinde a través de la acción de un complejo de endonucleasa asociado con la ARN polimerasa. El sitio de escisión generalmente se caracteriza por la presencia de la secuencia de bases AAUAAA cerca del sitio de escisión. Después de que se ha escindido el ARNm, se añaden residuos adenosina al extremo 3' libre en el sitio de escisión.

50 Tal como se utiliza en esta memoria, "transitorio" se refiere a la expresión de un transgen no integrado durante un período de horas, días o semanas, en donde el período de tiempo de expresión es menor que el período de tiempo para la expresión del gen si está integrado dentro del genoma o está contenido dentro de un replicón plasmídico estable en la célula huésped.

60 La expresión "vía de transducción de señales" se refiere a la relación bioquímica entre una diversidad de moléculas de transducción de señales que juegan un papel en la transmisión de una señal de una porción de una célula a otra porción de una célula. La expresión "receptor de superficie celular" incluye moléculas y complejos de moléculas capaces de recibir una señal y transmitir la señal a través de la membrana de una célula.

El término "sujeto" pretende incluir organismos vivos en los que se puede provocar una respuesta inmune (p. ej., mamíferos, ser humano).

La expresión "sustancialmente purificada" se refiere a una célula que está esencialmente libre de otros tipos de células. Una célula sustancialmente purificada también se refiere a una célula que ha sido separada de otros tipos de células con los que normalmente está asociada en su estado natural. En algunos casos, una población de células sustancialmente purificadas se refiere a una población de células homogénea. En otros casos, esta expresión se refiere simplemente a la célula que han sido separada de las células con las que están naturalmente asociadas en su estado natural. En algunos aspectos, las células se cultivan in vitro. En otros aspectos, las células no se cultivan in vitro.

El término "terapéutico", tal como se utiliza en esta memoria, significa un tratamiento. Se obtiene un efecto terapéutico por reducción, supresión, remisión o erradicación de un estado de enfermedad.

El término "profilaxis", tal como se utiliza en esta memoria, significa la prevención o el tratamiento protector para una enfermedad o estado de enfermedad.

En el contexto de la presente invención, "antígeno tumoral" o "antígeno de trastorno hiperproliferativo" o "antígeno asociado con un trastorno hiperproliferativo" se refiere a antígenos que son comunes a trastornos hiperproliferativos específicos. En determinados aspectos, los antígenos del trastorno hiperproliferativo de la presente invención se derivan de cánceres que incluyen, pero no se limitan a melanoma primario o metastásico, timoma, linfoma, sarcoma, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, linfoma no Hodgkin, leucemias, cáncer uterino, cáncer cervical, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, y adenocarcinomas tales como cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, y similares.

El término "transfectado" o "transformado" o "transducido" se refiere a un proceso por el cual el ácido nucleico exógeno se transfiere o introduce en la célula huésped. Una célula "transfectada" o "transformada" o "transducida" es una que ha sido transfectada, transformada o transducida con ácido nucleico exógeno. La célula incluye la célula objeto principal y su progenie.

La expresión "se une específicamente" se refiere a un anticuerpo, o un ligando, que reconoce a y se une con un participante en la unión afín (p. ej., una molécula estimulante y/o co-estimulante presente en una célula T), proteína presente en una muestra, pero que el anticuerpo o ligando no reconoce sustancialmente ni se une a otras moléculas en la muestra.

Intervalos: a lo largo de esta divulgación, diversos aspectos de la invención se pueden presentar en un formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalo es meramente por conveniencia y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible en el alcance de la invención. Por consiguiente, se debe considerar que la descripción de un intervalo ha descrito específicamente todos los posibles sub-intervalos, así como los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, se debe considerar que la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 ha descrito específicamente sub-intervalos tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 y 6. Como otro ejemplo, un intervalo tal como 95-99% de identidad, incluye algo con 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad, e incluye sub-intervalos tales como 96-99%, 96-98%, 96-97%, 97-99%, 97-98% y 98-99% de identidad. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

Descripción

En esta memoria se proporcionan composiciones de materia y métodos de uso para el tratamiento de una enfermedad tal como cáncer, utilizando un receptor de antígeno quimérico (CAR) anti-EGFRvIII.

En esta memoria se describe un cierto número de receptores de antígenos quiméricos que comprenden un anticuerpo o fragmento de anticuerpo diseñado para unirse específicamente a una proteína EGFRvIII. Una célula (p. ej., célula T) puede diseñarse para expresar un CAR, en donde la célula T CAR ("CART") exhibe una propiedad antitumoral. En un aspecto, una célula se transforma con el CAR y el CAR se expresa en la superficie celular. La célula (p. ej., célula T) se puede transducir con un vector viral que codifica un CAR, tal como un vector retroviral o un vector lentiviral. La célula puede expresar establemente el CAR. La célula (p. ej., célula T) se puede transfectar con un ácido nucleico, p. ej., ARNm, ADNc, ADN, que codifica un CAR. En tales casos, la célula puede expresar transitoriamente el CAR.

En un aspecto, la porción de unión a proteína EGFRvIII del CAR es un fragmento de anticuerpo scFv. En un aspecto, tales fragmentos de anticuerpos son funcionales, debido a que retienen la afinidad de unión equivalente, p. ej., se unen al mismo antígeno con una eficacia equiparable a la del anticuerpo IgG del que se deriva. En un aspecto, fragmentos de anticuerpos de este tipo son funcionales porque proporcionan una respuesta biológica que puede incluir, pero no se limita a, activación de una respuesta inmune, inhibición del origen de la transducción de señales de su antígeno diana, inhibición de la actividad de quinasas y similares, como entenderá un experto.

En un aspecto, el dominio de unión al antígeno EGFRvIII del CAR es un fragmento de anticuerpo scFv murino. En otro aspecto, el dominio de unión al antígeno EGFRvIII del CAR es un fragmento de anticuerpo scFv que está humanizado en comparación con la secuencia murina del scFv del que deriva. La generación de un anticuerpo monoclonal murino parental

a modo de ejemplo contra EGFRvIII (3C10) se describe en Okamoto et al. (British J. Cancer 1996, 73:1366-1372). Un anticuerpo completamente humano contra EGFRvIII (139) a modo de ejemplo se describe en Morgan et al. (2012) Human Gene Therapy, 23: 1043-1953. En un aspecto, el scFv para la secuencia murina comprende SEQ ID NO: 11. La humanización de este scFv de ratón puede desearse para el entorno clínico, en que los residuos específicos para ratón pueden inducir una respuesta antígeno-anti-ratón- humana (HAMA) en pacientes que reciben tratamiento con EGFRvIII, p. ej., tratamiento con células T transducidas con la construcción de EGFRvIII.

En un aspecto, la porción del dominio de unión anti-EGFRvIII de un CAR es codificada por un transgen cuya secuencia ha sido optimizada en codones para la expresión en una célula de mamífero. En un aspecto, la construcción CAR completa de la invención es codificada por un transgen cuya secuencia completa ha sido optimizada en codones para la expresión en una célula de mamífero. La optimización en codones se refiere al descubrimiento de que la frecuencia de aparición de codones sinónimos (es decir, codones que codifican el mismo aminoácido) en el ADN codificante está sesgada en diferentes especies. Una degeneración en codones de este tipo permite que un polipéptido idéntico sea codificado por una diversidad de secuencias de nucleótidos. En la técnica se conoce una diversidad de métodos de optimización en codones, que incluyen, p. ej., los métodos descritos en al menos las patentes de EE.UU. N.º 5.786.464 y 6.114.148.

En un aspecto, el dominio de unión anti-EGFRvIII de un CAR es un dominio de unión anti-EGFRvIII humanizado. Por ejemplo, el dominio de unión anti-EGFRvIII humanizado comprende la porción scFv proporcionada en SEQ ID NO: 68.

En un aspecto, un CAR descrito en esta memoria incluye un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo específico con un dominio de señalización intracelular. Por ejemplo, en algunos aspectos, el dominio de señalización intracelular incluye, pero no se limita a la cadena CD3-zeta, los módulos de señalización 4-1BB y CD28 y combinaciones de los mismos.

El dominio de unión a antígeno se une a EGFRvIII. En un aspecto, el CAR comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 73.

En un aspecto, el CAR comprende al menos un dominio de señalización intracelular seleccionado del grupo que consiste en un dominio de señalización CD137 (4-1BB), un dominio de señalización CD28, un dominio de señal CD3zeta y cualquier combinación de los mismos. En un aspecto, el CAR comprende al menos un dominio de señalización intracelular de una o más moléculas co-estimulantes distintas de un dominio de señal CD137 (4-1BB) o CD28, un CD3zeta y cualquier combinación de los mismos.

Se describen composiciones de CAR y su uso en medicamentos o métodos para tratar, entre otras enfermedades, cáncer o cualquier tumor maligno o enfermedades autoinmunes que implican células o tejidos que expresan EGFRvIII.

Se describen también composiciones y métodos para la sobre-expresión de miR-17-92, p. ej., en una célula que expresa el CAR, p. ej., una célula T. En un aspecto, la sobre-expresión derivada de transgenes de miR-17-92 proporciona una célula T transducida por CAR con resistencia mejorada frente a la inmunosupresión inducida por tumores y la quimioterapia, fomentando así efectos terapéuticos duraderos.

Receptor de Antígeno Quimérico (CAR)

La presente invención se refiere a una construcción de ADN recombinante que comprende secuencias que codifican un CAR, en donde el CAR comprende un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a EGFRvIII, p. ej., un fragmento de anticuerpo humano que se une específicamente a EGFRvIII. En un aspecto, el EGFRvIII es EGFRvIII humano, y la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el fragmento de anticuerpo es contigua y está en el mismo marco de lectura que una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un dominio de señalización intracelular. El dominio de señalización intracelular puede comprender un dominio de señalización co-estimulante y/o un dominio de señalización primario, p. ej., una cadena zeta. El dominio de señalización co-estimulante se refiere a una porción del CAR que comprende al menos una porción del dominio intracelular de una molécula co-estimulante.

Se describe una construcción de CAR que comprende un dominio scFv seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 80 y SEQ ID NO: 86, en donde el scFv puede estar precedido por una secuencia conductora opcional tal como se proporciona en SEQ ID NO: 13, y seguida de una secuencia bisagra opcional tal como se proporciona en SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 104 o SEQ ID NO: 106 o SEQ ID NO: 108, una región de transmembrana tal como se proporciona en SEQ ID NO: 15, un dominio de señalización intracelular que incluye SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO: 102 y una secuencia CD3 zeta que incluye SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 99, en donde los dominios están contiguos a y en el mismo marco de lectura para formar una proteína de fusión sencilla. También se describe una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de cada uno de los fragmentos de scFv seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 80 y SEQ ID NO: 86 y cada uno de los dominios de SEQ ID NOS: 13-17. También se describe una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de cada uno de los fragmentos de scFv seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 80 y SEQ ID NO: 86 y cada uno de los dominios de SEQ ID NOS: 13-16 y SEQ ID NO: 99. En un aspecto, la construcción CAR EGFRvIII

- comprende una secuencia conductora opcional, un dominio de unión a antígeno extracelular que se une específicamente a EGFRvIII, una bisagra, un dominio de transmembrana y un dominio estimulante intracelular. En un aspecto, la construcción CAR EGFRvIII comprende una secuencia conductora opcional, un dominio de unión a antígeno extracelular que se une específicamente a EGFRvIII, una bisagra, un dominio de transmembrana, un dominio de señalización intracelular que incluye un dominio co-estimulante y un dominio estimulante principal. Construcciones CAR EGFRvIII específicas que contienen un dominio scFv humanizado se proporcionan en SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 85 y SEQ ID NO: 90. Construcciones CAR EGFRvIII específicas que contienen un dominio scFv murino se proporcionan en SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2.
- Una secuencia conductora a modo de ejemplo se proporciona como SEQ ID NO: 13. Una secuencia de bisagra/espaciador a modo de ejemplo se proporciona como SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO:104 o SEQ ID NO: 106 o SEQ ID NO: 108. Una secuencia del dominio de transmembrana a modo de ejemplo se proporciona como SEQ ID NO: 15. Una secuencia a modo de ejemplo del dominio co-estimulante de la proteína 4-1BB se proporciona como SEQ ID NO: 16. Una secuencia a modo de ejemplo del dominio co-estimulante de la proteína CD27 se proporciona como SEQ ID NO: 102. Un dominio de señalización principal a modo de ejemplo de una secuencia del dominio CD3zeta se proporciona como SEQ ID NO: 17. Otro dominio de señalización principal a modo de ejemplo de una secuencia de dominio CD3zeta se proporciona como SEQ ID NO: 99.
- En esta memoria se describe una construcción de ácido nucleico recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un CAR, en donde la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión anti-EGFRvIII, p. ej., descrito en esta memoria, que es contiguo y está en el mismo marco de lectura que una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de señalización intracelular. En un aspecto, el dominio de unión anti-EGFRvIII se selecciona de una o más de SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 80 y SEQ ID NO: 86. En un aspecto, el dominio de unión anti-EGFRvIII es codificado por una secuencia de nucleótidos proporcionada en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 81 y SEQ ID NO: 98. En un aspecto, el dominio de unión anti-EGFRvIII es codificado por SEQ ID NO: 39. En un aspecto, el dominio de unión anti-EGFRvIII es codificado por SEQ ID NO: 45. En un aspecto, el dominio de unión anti-EGFRvIII es codificado por SEQ ID NO: 51. En un aspecto, el dominio de unión anti-EGFRvIII es codificado por SEQ ID NO: 57. En un aspecto, el dominio de unión anti-EGFRvIII es codificado por SEQ ID NO: 63. En un aspecto, el dominio de unión anti-EGFRvIII es codificado por SEQ ID NO: 69. En un aspecto, el dominio de unión anti-EGFRvIII es codificado por SEQ ID NO: 75. En un aspecto, el dominio de unión anti-EGFRvIII es codificado por SEQ ID NO: 81.
- Se describe una construcción de ácido nucleico recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un CAR, en donde la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un dominio de unión anti-EGFRvIII seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 84 y SEQ ID NO: 90, en donde la secuencia está contigua a y en el mismo marco de lectura que la secuencia de ácidos nucleicos que codifica un dominio de señalización intracelular. Un dominio de señalización intracelular a modo de ejemplo que se puede utilizar en el CAR incluye, pero no se limita a, uno o más dominios de señalización intracelular de, p. ej., CD3-zeta, CD28, 4-1BB y similares. En algunos casos, el CAR puede comprender cualquier combinación de dominios de señalización intracelular de CD3-zeta, CD28, 4-1BB y similares. En un aspecto, la construcción de ácidos nucleicos comprende la SEQ ID NO: 42. En un aspecto, la secuencia de ácidos nucleicos de una construcción de CAR es SEQ ID NO: 48. En un aspecto, la construcción de ácidos nucleicos comprende la SEQ ID NO: 54. En un aspecto, la construcción de ácidos nucleicos comprende la SEQ ID NO: 60. En un aspecto, la construcción de ácidos nucleicos comprende la SEQ ID NO: 66. En un aspecto, la construcción de ácidos nucleicos comprende la SEQ ID NO: 72. En un aspecto, la construcción de ácidos nucleicos comprende la SEQ ID NO: 78. En un aspecto, la construcción de ácidos nucleicos comprende la SEQ ID NO: 84.
- Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las moléculas deseadas se pueden obtener utilizando métodos recombinantes conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, seleccionando colecciones de células que expresan el gen, derivando el gen de un vector que se sabe que incluye el mismo, o aislando directamente de células y tejidos que lo contienen, utilizando técnicas estándar. Alternativamente, el ácido nucleico de interés puede producirse sintéticamente, en lugar de clonarse.
- Construcciones de vectores retrovirales y lentivirales que expresan un CAR que se pueden transducir directamente a una célula.
- Una construcción de ARN se puede transfectar directamente en una célula. Un método para generar ARNm para su uso en la transfección implica la transcripción in vitro (IVT) de un molde con cebadores especialmente diseñados, seguido de la adición de poliA, para producir una construcción que contiene la secuencia no traducida 3' y 5' ("UTR"), un remate 5' y/o un Sitio Interno de Entrada al Ribosoma (IRES), el ácido nucleico que se ha de expresar y una cola de poliA, típicamente de 50 a 2000 bases de longitud. El ARN así producido puede transfectar eficientemente diferentes tipos de células. El molde puede incluir secuencias para el CAR. Un vector de ARN CAR se puede transducir en una célula T por electroporación.

Dominio de unión a antígeno

El CAR de la invención comprende un elemento de unión específica a diana al que se hace referencia de otra manera como un dominio de unión a antígeno. Generalmente, la elección del resto depende del tipo y del número de ligandos que definen la superficie de una célula diana. Por ejemplo, el dominio de unión a antígeno se puede elegir para reconocer un ligando que actúa como un marcador de la superficie celular en las células diana asociadas con un estado de enfermedad particular. Por lo tanto, ejemplos de marcadores de superficie celular que pueden actuar como ligandos para el dominio de unión a antígeno en un CAR incluyen los asociados con infecciones virales, bacterianas y parasitarias, enfermedades autoinmunes y células cancerosas.

La respuesta de células T mediada por CAR se puede dirigir a un antígeno de interés mediante la ingeniería de un dominio de unión a antígeno que se una específicamente a un antígeno deseado en el CAR.

La porción del CAR de la invención que comprende el dominio de unión a antígeno fija como objetivo EGFRvIII. En un aspecto, el dominio de unión a antígeno fija como objetivo EGFRvIII humano. Por ejemplo, se produjo un anticuerpo monoclonal de ratón (IgG2b) 3C10 contra EGFRvIII mediante inmunización de ratones con un péptido de 14 aminoácidos (LEEKKGNYVVT DHC; SEQ ID NO: 101) que incluye la unión de fusión específica para EGFRvIII y demostró un reconocimiento altamente específico de EGFRvIII sin ningún tipo de unión detectable a EGFR de tipo salvaje (Okamoto et al, British J. Cancer 1996, 73:1366-1372). Por consiguiente, en algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno fija como objetivo una secuencia de aminoácidos, p. ej., una secuencia de aminoácidos que comprende un residuo glicina añadido, dentro del dominio de unión de fusión EGFRvIII. En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno fija como objetivo una o más secuencias de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:101.

El dominio de unión a antígeno puede ser cualquier dominio que se una al antígeno, incluyendo, pero no limitado a un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado y un fragmento funcional del mismo. En algunos casos, es beneficioso que el dominio de unión a antígeno se derive de la misma especie en la que finalmente se utilizará el CAR. Por ejemplo, para uso en seres humanos, puede ser beneficioso que el dominio de unión a antígeno del CAR comprenda residuos humanos o humanizados para el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

Por lo tanto, en un aspecto, el dominio de unión a antígeno comprende un anticuerpo humano o un fragmento de anticuerpo. En otro aspecto, el dominio de unión a antígeno comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo humanizado. En un aspecto, el dominio de unión a anti-EGFRvIII comprende una o más (p. ej., una, dos o las tres) regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera 1 (LC CDR1), región determinante de complementariedad de cadena ligera 2 (LC CDR2) y región determinante de complementariedad de cadena ligera 3 (LC CDR3) de un dominio de unión anti-EGFRvIII descrito en esta memoria, y una o más (p. ej., una, dos o las tres) regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada 1 (HC CDR1), región determinante de complementariedad de cadena pesada 2 (HC CDR2), y región determinante de complementariedad de cadena pesada 3 (HC CDR3) de un dominio de unión anti-EGFRvIII descrito en esta memoria. En un aspecto, el dominio de unión anti-EGFRvIII comprende una región variable de cadena ligera descrita en esta memoria y/o una región variable de cadena pesada descrita en esta memoria. En un aspecto, el dominio de unión anti-EGFRvIII es un scFv que comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada de una secuencia de aminoácidos, p. ej., una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada descritas en esta memoria. En un aspecto, el dominio de unión anti-EGFRvIII (p. ej., un scFv) comprende: una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (p. ej., sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (p. ej., sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena ligera proporcionada en esta memoria, o una secuencia con un 85-99% (p. ej., 90-99% o 95-99%) de identidad con una secuencia de aminoácidos proporcionada en esta memoria; y/o una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (p. ej., sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (p. ej., sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena pesada proporcionada en esta memoria, o una secuencia con un 85-99% (p. ej., 90-99% o 95-99%) de identidad con una secuencia de aminoácidos proporcionada en esta memoria. En un aspecto, el dominio de unión a antígeno comprende una o más secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 80 y SEQ ID NO: 86. En un aspecto, el CAR humanizado se selecciona de una o más secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 85 y SEQ ID NO: 90.

En algunos aspectos, un anticuerpo no humano se humaniza, en donde las secuencias o regiones específicas del anticuerpo se modifican para incrementar la similitud con un anticuerpo producido de forma natural en un ser humano o fragmento del mismo. En un aspecto, el dominio de unión a antígeno está humanizado.

Se puede producir un anticuerpo humanizado utilizando una diversidad de técnicas conocidas en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, injerto de CDR (véase, por ejemplo, la Patente Europea N° EP 239.400; Publicación Internacional N° WO 91/09967; y las Patentes de EE.UU. N°s 5.225.539, 5.530.101 y 5.585.089, chapado o revestimiento (véase, p. ej.,

las Patentes Europeas N^{os} EP 592.106 y EP 519.596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology*, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, *Protein Engineering*, 7(6):805-814; y Roguska et al., 1994, *PNAS*, 91: 969-973, mezcla de cadenas (véase, p. ej., la Patente de EE.UU. N^o 5.565.332, y técnicas descritas en, p. ej. la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N^o US2005/0042664, la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N^o US2005/0048617, la patente de EE.UU. N^o 6.407.213, la patente de EE.UU. N^o 5.766.886, la Publicación Internacional N^o WO 9317105, Tan et al., 2002, *J. Immunol.*, 169:1119-25; Caldas et al., 2000, *Protein Eng.*, 13(5):353-60; Morea et al., 2000, *Methods*, 20:267-79; Baca et al., 1997, *J. Biol. Chem.*, 272: 10678-84; Roguska et al., 1996, *Protein Eng.*, 9(10):895-904; Couto et al., 1995, *Cancer Res.*, 55: 5973s-5977; Couto et al., 1995, *Cancer Res.*, 55(8):1717-22; Sandhu 1994 *Gene*, 150(2):409-10; y Pedersen et al., 1994, *J. Mol. Biol.*, 235 (3): 959-73. A menudo, los residuos marco en las regiones marco se sustituirán con el residuo correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar, por ejemplo, mejorar la unión al antígeno. Estas sustituciones marco se identifican por métodos bien conocidos en la técnica, p. ej., modelando las interacciones de la CDR y los residuos marco para identificar residuos marco importantes para la unión a antígeno y la comparación de la secuencia para identificar residuos marco inusuales en posiciones particulares. (Véanse, p. ej., Queen et al., patente de EE.UU. N^o 5.585.089; y Riechmann et al., 1988, *Nature*, 332:323).

Un anticuerpo humanizado o fragmento de anticuerpo tiene uno o más residuos aminoácidos restantes en él de una fuente que no es humana. A estos residuos aminoácidos no humanos se les alude a menudo como residuos "importados", que típicamente se toman de un dominio variable "importado". Tal como se proporciona en esta memoria, los anticuerpos humanizados o los fragmentos de anticuerpos comprenden una o más CDRs de moléculas de inmunoglobulina no humanas y regiones marco en las que los residuos aminoácidos que comprenden el marco se derivan completa o principalmente de la línea germinal humana. Múltiples técnicas para la humanización de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos son bien conocidas en la técnica y pueden realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo CDRs de roedores o secuencias de CDR por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano, es decir, injerto de CDR (documento EP 239.400; Publicación PCT N^o WO 91/09967; y patentes de EE.UU. N^{os} 4.816.567; 6.331.415; 5.225.539; 5.530.101; 5.585.089; 6.548.640). En anticuerpos y fragmentos de anticuerpos humanizados de este tipo, sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. Los anticuerpos humanizados son a menudo anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de marco (FR) están sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores. La humanización de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos también se puede lograr mediante chapado o revestimiento (documentos EP 592.106; EP 519.596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology*, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., *Protein Engineering*, 7(6):805-814 (1994); y Roguska et al., *PNAS*, 91:969-973 (1994)) o mezcla de cadenas (patente de EE.UU. N^o 5.565.332).

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, a utilizar en la producción de los anticuerpos humanizados es reducir la antigenicidad. De acuerdo con el denominado método de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se rastrea frente a toda la colección de secuencias conocidas de dominio variable humano. La secuencia humana más cercana a la del roedor se acepta entonces como marco humano (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims et al., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). Otro método utiliza un marco particular derivado de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo marco se puede utilizar para varios anticuerpos humanizados diferentes (véase, p. ej., Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

En algunos aspectos, la porción de una composición de CAR de la invención que comprende un fragmento de anticuerpo se humaniza con retención de alta afinidad por el antígeno diana y otras propiedades biológicas favorables. Anticuerpos y fragmentos de anticuerpos humanizados se pueden preparar mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Modelos tridimensionales de inmunoglobulina están comúnmente disponibles y son familiares para los expertos en la técnica. Están disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas muestras permite el análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, p. ej., el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse al antígeno diana. De esta forma, los residuos FR pueden seleccionarse y combinarse de secuencias del receptor y de importación de modo que se logre la característica deseada de anticuerpo o fragmento de anticuerpo, tal como una afinidad incrementada por el antígeno diana. En general, los residuos de CDR están directamente y más sustancialmente implicados en influir en la unión a antígeno.

En un aspecto, el dominio de unión anti-EGFRvIII es, por ejemplo, un Fv, un Fab o un (Fab')₂, o un anticuerpo híbrido bi-funcional (p. ej., bi-específico) (p. ej., Lanzavecchia et al., *Eur. J. Immunol.* 17, 105 (1987)). En un aspecto, un fragmento de anticuerpo proporcionado en esta memoria es un scFv. En un aspecto, el scFv se une a una proteína EGFRvIII, pero no a EGFR de tipo salvaje. En algunos casos, un scFv humano también puede derivarse de una colección de visualización de levaduras.

En algunos casos, los scFv pueden prepararse de acuerdo con el método conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Bird et al., (1988) *Science* 242:423-426 y Huston et al., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Las moléculas ScFv

5 pueden producirse enlazando regiones VH y VL juntas utilizando enlazadores de polipéptidos flexibles. Las moléculas de scFv comprenden un enlazador (p. ej., un enlazador Ser-Gly) con una longitud optimizada y/o composición de aminoácidos. La longitud del enlazador puede afectar en gran medida la forma en que las regiones variables de un scFv se pliegan e interactúan. De hecho, si se emplea un enlazador de polipéptido corto (p. ej., entre 5-10 aminoácidos, se evita el plegamiento intracadena. También se requiere el plegamiento entre cadenas para unir las dos regiones variables para formar un sitio de unión del epítipo funcional. Para ejemplos de orientación del enlazador y tamaño, véase, p. ej., Hollinger et al. 1993 Proc Natl Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448, Publicaciones de Solicitud de Patente de EE.UU. N°s 2005/0100543, 2005/0175606, 2007/0014794 y publicaciones PCT N°s WO2006/020258 y WO2007/024715.

10 Un scFv puede comprender un enlazador de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más residuos aminoácidos entre sus regiones VL y VH. La secuencia de enlazador puede comprender cualquier aminoácido que se produce de forma natural. En algunas realizaciones, la secuencia de enlazador comprende aminoácidos glicina y serina. En otra realización, la secuencia de enlazador comprende conjuntos de repeticiones de glicina y serina tales como (Gly₄Ser)_n (SEQ ID NO: 37), en que n es un número entero positivo igual a o mayor que 1. En una realización, el enlazador puede ser (Gly₄Ser)₄ (SEQ ID NO: 113) o (Gly₄Ser)₃ (SEQ ID NO: 114). La variación en la longitud del enlazador puede retener o potenciar la actividad, dando lugar a una eficacia superior en estudios de actividad.

20 Estabilidad y Mutaciones

La estabilidad de un dominio de unión anti-EGFRvIII, p. ej., moléculas de scFv (p. ej., scFv soluble), puede evaluarse en referencia a las propiedades biofísicas (p. ej., estabilidad térmica) de una molécula de scFv control convencional o un anticuerpo de longitud completa. En una realización, el scFv humanizado tiene una estabilidad térmica que es mayor que aproximadamente 0,1, aproximadamente 0,25, aproximadamente 0,5, aproximadamente 0,75, aproximadamente 1, aproximadamente 1,25, aproximadamente 1,5, aproximadamente 1,75, aproximadamente 2, aproximadamente 2,5, aproximadamente 3, aproximadamente 3,5, aproximadamente 4, aproximadamente 4,5, aproximadamente 5, aproximadamente 5,5, aproximadamente 6, aproximadamente 6,5, aproximadamente 7, aproximadamente 7,5, aproximadamente 8, aproximadamente 8,5, aproximadamente 9, aproximadamente 9,5, aproximadamente 10 grados, aproximadamente 11 grados, aproximadamente 12 grados, aproximadamente 13 grados, aproximadamente 14 grados o aproximadamente 15 grados Celsius que una molécula de unión control (p. ej., una molécula scFv convencional) en los ensayos descritos.

La estabilidad térmica mejorada del dominio de unión anti-EGFRvIII, p. ej., scFv, se confiere posteriormente a la construcción EGFRvIII CAR completa, lo que conduce a propiedades terapéuticas mejoradas de la construcción EGFRvIII CAR. La estabilidad térmica del dominio de unión anti-EGFRvIII, p. ej., scFv, puede mejorarse en al menos aproximadamente 2°C o 3°C en comparación con un anticuerpo convencional. En una realización, el dominio de unión anti-EGFRvIII, p. ej., scFv, tiene una estabilidad térmica mejorada a 1°C en comparación con un anticuerpo convencional. En otra realización, el dominio de unión anti-EGFRvIII, p. ej., scFv, tiene una estabilidad térmica mejorada a 2°C en comparación con un anticuerpo convencional. En otra realización, el dominio de unión anti-EGFRvIII, p. ej., scFv, tiene una estabilidad térmica mejorada a 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15°C en comparación con un anticuerpo convencional. Se pueden hacer comparaciones, por ejemplo, entre las moléculas de scFv descritas en esta memoria y las moléculas scFv o fragmentos Fab de un anticuerpo del que se derivaron las VH y VL de scFv. La estabilidad térmica se puede medir utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización, se puede medir la T_m.

45 Métodos para medir la T_m y otros métodos para determinar la estabilidad de la proteína se describen con más detalle más adelante.

50 Mutaciones en scFv (que surgen a través de la humanización o mutagénesis directa del scFv soluble) alteran la estabilidad del scFv y mejoran la estabilidad global del scFv y la construcción EGFRvIII CAR. La estabilidad del scFv humanizado se compara con el scFv murino utilizando mediciones tales como T_m, desnaturalización por temperatura y agregación por temperatura. La capacidad de unión de los scFvs mutantes se puede determinar utilizando los ensayos descritos en los Ejemplos.

55 En una realización, el dominio de unión anti-EGFRvIII, p. ej., scFv, comprende al menos una mutación que surge del proceso de humanización, de modo que el scFv mutado confiere estabilidad mejorada a la construcción de EGFRvIII. En otra realización, el dominio de unión anti-EGFRvIII, p. ej., scFv, comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mutaciones que surge del proceso de humanización, de modo que el scFv mutado confiere estabilidad mejorada a la construcción de EGFRvIII.

60 Métodos de Evaluación de la Estabilidad de la Proteína

La estabilidad de un dominio de unión a antígeno puede evaluarse utilizando, p. ej., los métodos descritos más adelante. Estos métodos permiten la determinación de múltiples transiciones de despliegue térmico, en que el dominio menos estable se despliega primero o limita el umbral de estabilidad global de una unidad multi-dominio que se despliega cooperativamente (p. ej., una proteína multi-dominio que exhibe una única transición de despliegue). El dominio menos

estable se puede identificar en un cierto número de maneras adicionales. La mutagénesis se puede realizar para sondear qué dominio limita la estabilidad global. Adicionalmente, la resistencia a la proteasa de una proteína multi-dominio se puede realizar en condiciones en las que se sabe que el dominio menos estable se despliega intrínsecamente a través de DSC u otros métodos espectroscópicos (Fontana, et al., (1997) Fold. Des., 2: R17-26; Dimasi et al. (2009) J. Mol. Biol. 393: 672-692). Una vez que se identifica el dominio menos estable, la secuencia que codifica este dominio (o una porción de la misma) puede emplearse como una secuencia de prueba en los métodos.

a) Estabilidad Térmica

La estabilidad térmica de las composiciones puede analizarse utilizando un cierto número de técnicas biofísicas o bioquímicas no limitantes conocidas en la técnica. En determinadas realizaciones, la estabilidad térmica se evalúa mediante espectroscopía analítica.

Un método a modo de ejemplo de espectroscopía analítica es la Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC, por sus siglas en inglés). La DSC emplea un calorímetro que es sensible a las absorbancias de calor que acompañan al despliegue de la mayoría de las proteínas o dominios de proteínas (véase, p. ej., Sanchez-Ruiz, et al., Biochemistry, 27: 1648-52, 1988). Para determinar la estabilidad térmica de una proteína, se inserta una muestra de la proteína en el calorímetro y la temperatura se eleva hasta que se despliega el Fab o scFv. La temperatura a la que se despliega la proteína es indicativa de la estabilidad global de la proteína.

Otro método a modo de ejemplo de espectroscopía analítica es la espectroscopía de Dicroísmo Circular (CD, por sus siglas en inglés). La espectrometría de CD mide la actividad óptica de una composición en función del aumento de la temperatura. La espectroscopía de dicroísmo circular (CD) mide las diferencias en la absorción de la luz polarizada para zurdos frente a la luz polarizada para diestros que surgen debido a la asimetría estructural. Una estructura desordenada o desplegada da como resultado un espectro de CD muy diferente al de una estructura ordenada o plegada. El espectro de CD refleja la sensibilidad de las proteínas a los efectos desnaturizantes del aumento de la temperatura y, por lo tanto, es indicativo de la estabilidad térmica de una proteína (véase van Mierlo y Steemsma, J. Biotechnol., 79(3):281-98, 2000).

Otro método de espectroscopía analítica a modo de ejemplo para medir la estabilidad térmica es la Espectroscopía de Emisión de Fluorescencia (véase van Mierlo y Steemsma, supra). Aún otro método de espectroscopía analítica a modo de ejemplo para medir la estabilidad térmica es la espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) (véase, p. ej., van Mierlo y Steemsma, supra).

La estabilidad térmica de una composición se puede medir bioquímicamente. Un método bioquímico a modo de ejemplo para evaluar la estabilidad térmica es un ensayo de desafío térmico. En un "ensayo de desafío térmico", una composición se somete a un intervalo de temperaturas elevadas durante un período de tiempo establecido. Por ejemplo, en una realización, las moléculas de scFv de prueba o las moléculas que comprenden moléculas de scFv se someten a un intervalo de temperaturas crecientes, p. ej., durante 1-1,5 horas. La actividad de la proteína se analiza luego mediante un ensayo bioquímico relevante. Por ejemplo, si la proteína es una proteína de unión (p. ej., un scFv o un polipéptido que contiene scFv), la actividad de unión de la proteína de unión puede determinarse mediante un ELISA funcional o cuantitativo.

Un ensayo de este tipo puede realizarse en un formato de alto rendimiento y los descritos en los Ejemplos utilizando E. coli y rastreo de alto rendimiento. Se puede crear una colección de dominio de unión anti-EGFRvIII, p. ej., scFv, variantes, utilizando métodos conocidos en la técnica. Se puede inducir la expresión del dominio de unión anti-EGFRvIII, p. ej., scFv, y el dominio de unión anti-EGFRvIII, p. ej., scFv, se puede someter a un desafío térmico. Las muestras de prueba estimuladas pueden analizarse para determinar la unión y aquellos dominios de unión anti-EGFRvIII, p. ej., scFvs, que son estables, pueden ampliarse y caracterizarse adicionalmente.

La estabilidad térmica se evalúa midiendo la temperatura de fusión (T_m) de una composición utilizando cualquiera de las técnicas anteriores (p. ej., técnicas de espectroscopía analítica). La temperatura de fusión es la temperatura en el punto medio de una curva de transición térmica en la que el 50% de las moléculas de una composición están en estado plegado (véase, p. ej., Dimasi et al. (2009) J. Mol Biol. 393: 672-692). En una realización, los valores de T_m para un dominio de unión anti-EGFRvIII, p. ej., scFv, son aproximadamente 40°C, 41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C, 46°C, 47°C, 48°C, 49°C, 50°C, 51°C, 52°C, 53°C, 54°C, 55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C, 60°C, 61°C, 62°C, 63°C, 64°C, 65°C, 66°C, 67°C, 68°C, 69°C, 70°C, 71°C, 72°C, 73°C, 74°C, 75°C, 76°C, 77°C, 78°C, 79°C, 80°C, 81°C, 82°C, 83°C, 84°C, 85°C, 86°C, 87°C, 88°C, 89°C, 90°C, 91°C, 92°C, 93°C, 94°C, 95°C, 96°C, 97°C, 98°C, 99°C, 100°C. En una realización, los valores de T_m para una IgG son aproximadamente 40°C, 41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C, 46°C, 47°C, 48°C, 49°C, 50°C, 51°C, 52°C, 53°C, 54°C, 55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C, 60°C, 61°C, 62°C, 63°C, 64°C, 65°C, 66°C, 67°C, 68°C, 69°C, 70°C, 71°C, 72°C, 73°C, 74°C, 75°C, 76°C, 77°C, 78°C, 79°C, 80°C, 81°C, 82°C, 83°C, 84°C, 85°C, 86°C, 87°C, 88°C, 89°C, 90°C, 91°C, 92°C, 93°C, 94°C, 95°C, 96°C, 97°C, 98°C, 99°C, 100°C.

La estabilidad térmica también se evalúa midiendo el calor específico o la capacidad calorífica (C_p) de una composición utilizando una técnica calorimétrica analítica (p. ej., DSC). El calor específico de una composición es la energía (p. ej., en kcal/mol) que se requiere para aumentar en 1°C la temperatura de 1 mol de agua. Como C_p grande es un sello distintivo de una composición de proteína desnaturalizada o inactiva. El cambio en la capacidad calorífica (ΔC_p) de una composición se mide determinando el calor específico de una composición antes y después de su transición térmica. La estabilidad térmica también puede evaluarse midiendo o determinando otros parámetros de estabilidad termodinámica, incluida la energía de desplegamiento libre de Gibbs (ΔG), la entalpía de desplegamiento (ΔH) o la entropía de desplegamiento (ΔS). Uno o más de los ensayos bioquímicos anteriores (p. ej., un ensayo de desafío térmico) se utilizan para determinar la temperatura (es decir, el valor T_c) en el que el 50% de la composición retiene su actividad (p. ej., actividad de unión).

Además, mutaciones en el dominio de unión anti-EGFRvIII, p. ej., scFv, alteran la estabilidad térmica del dominio de unión anti-EGFRvIII, p. ej., scFv, en comparación con el dominio de unión anti-EGFRvIII no mutado, p. ej., scFv. Cuando el dominio de unión anti-EGFRvIII humanizado, p. ej., scFv, se incorpora en una construcción CAR anti-EGFRvIII, el dominio de unión anti-EGFRvIII, p. ej., scFv humanizado, confiere estabilidad térmica a la construcción CAR anti-EGFRvIII global. En una realización, el dominio de unión anti-EGFRvIII, p. ej., scFv, comprende una única mutación que confiere estabilidad térmica al dominio de unión anti-EGFRvIII, p. ej., scFv. En otra realización, el dominio de unión anti-EGFRvIII, p. ej., scFv, comprende múltiples mutaciones que confieren estabilidad térmica al dominio de unión anti-EGFRvIII, p. ej., scFv. En una realización, las múltiples mutaciones en el dominio de unión anti-EGFRvIII, p. ej., scFv, tienen un efecto aditivo sobre la estabilidad térmica del dominio de unión anti-EGFRvIII, p. ej., scFv.

b) % de Agregación

La estabilidad de una composición se puede determinar midiendo su propensión a agregarse. La agregación se puede medir mediante un número de técnicas bioquímicas o biofísicas no limitantes. Por ejemplo, la agregación de una composición puede evaluarse utilizando cromatografía, p. ej., cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, por sus siglas en inglés). La SEC separa moléculas en base al tamaño. Una columna se llena con perlas semi-sólidas de un gel polimérico que admitirá iones y moléculas pequeñas en su interior, pero no grandes. Cuando se aplica una composición proteica en la parte superior de la columna, las proteínas plegadas compactas (es decir, proteínas no agregadas) se distribuyen a través de un mayor volumen de disolvente que está disponible para los grandes agregados de proteínas. Por consiguiente, los agregados grandes se mueven más rápidamente a través de la columna, y de esta manera la mezcla se puede separar o fraccionar en sus componentes. Cada una de las fracciones se puede cuantificar por separado (p. ej., mediante dispersión de la luz) a medida que se eluye del gel. Por consiguiente, el % de agregación de una composición se puede determinar comparando la concentración de una fracción con la concentración total de proteína aplicada al gel. Las composiciones estables eluyen de la columna como esencialmente una fracción única y aparecen esencialmente como un pico único en el perfil de elución o cromatograma.

c) Afinidad de Unión

La estabilidad de una composición se puede evaluar determinando su afinidad de unión diana. En la técnica se conoce una amplia diversidad de métodos para determinar la afinidad de unión. Un método a modo de ejemplo para determinar la afinidad de unión emplea resonancia de plasmón superficial.

La resonancia del plasmón superficial es un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas dentro de una matriz de biosensores, por ejemplo, utilizando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, N.J.). Para descripciones adicionales, véanse Jonsson, U., et al. (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26; Jonsson, U., i (1991) *Biotechniques* 11:620-627; Johnsson, B., et al. (1995) *J. Mol. Recognit* 8:125-131; y Johnsson, B., et al. (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277.

En un aspecto, el dominio de unión al antígeno del CAR comprende una secuencia de aminoácidos que es homóloga a una secuencia de aminoácidos del dominio de unión al antígeno descrita en esta memoria, y el dominio de unión al antígeno retiene las propiedades funcionales deseadas de los fragmentos de anticuerpo anti-EGFRvIII descritos en esta memoria. En un aspecto específico, la composición de CAR de la invención comprende un fragmento de anticuerpo. En un aspecto adicional, ese fragmento de anticuerpo comprende un scFv.

En diversos aspectos, el dominio de unión al antígeno del CAR se modifica modificando uno o más aminoácidos dentro de una o ambas regiones variables (p. ej., VH y/o VL), por ejemplo dentro de una o más regiones CDR y/o dentro de una o más regiones marco. En un aspecto específico, la composición de CAR de la invención comprende un fragmento de anticuerpo. En un aspecto adicional, ese fragmento de anticuerpo comprende un scFv.

Un experto ordinario en la técnica entenderá que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención puede modificarse adicionalmente de modo que varíe en la secuencia de aminoácidos (p. ej., de tipo salvaje), pero no en la actividad deseada. Por ejemplo, pueden hacerse sustituciones adicionales de nucleótidos que conducen a sustituciones de aminoácidos en residuos aminoácidos "no esenciales" a la proteína. Por ejemplo, un residuo aminoácido no esencial en una molécula puede reemplazarse por otro residuo aminoácido de la misma familia de la cadena lateral. En otra

realización, una cadena de aminoácidos se puede reemplazar por una cadena estructuralmente similar que difiere en orden y/o composición de los miembros de la familia de la cadena lateral, p. ej., puede realizarse una sustitución conservadora, en la que un residuo aminoácido se reemplaza por un residuo aminoácido que tiene una cadena lateral similar.

5

Familias de residuos aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica, incluidas cadenas laterales de carácter básico (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales de carácter ácido (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (p. ej., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales con ramificaciones beta (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

10

El porcentaje de identidad en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias de polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias que son iguales. Dos secuencias son "sustancialmente idénticas" si dos secuencias tienen un porcentaje especificado de residuos aminoácidos o nucleótidos que son iguales (p. ej., 60% de identidad, opcionalmente 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad a lo largo de una región específica o, cuando no se especifica, a lo largo de toda la secuencia), cuando se compara y se alinea para obtener la correspondencia máxima en una ventana de comparación, o región designada como medida utilizando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante alineamiento manual e inspección visual. Opcionalmente, la identidad existe a lo largo de una región que es al menos de aproximadamente 50 nucleótidos (o 10 aminoácidos) de longitud o, más preferiblemente, a lo largo de una región que es 100 a 500 o 1000 o más nucleótidos (o 20, 50, 200 o más aminoácidos) de longitud.

15

20

Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la cual se comparan las secuencias de prueba. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de referencia y de prueba se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencias, cuando proceda, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencias. Se pueden utilizar los parámetros del programa por defecto o se pueden designar parámetros alternativos. A continuación, el algoritmo de comparación de secuencias calcula los porcentajes de identidades secuenciales para las secuencias de prueba respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa. Los métodos de alineamiento de secuencias para su comparación son muy conocidos en la técnica. El alineamiento óptimo de secuencias para la comparación se puede realizar, p. ej., mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, (1970) *Adv Appl. Math.* 2:482c, por el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, mediante la búsqueda del método de similitud de Pearson y Lipman, (1988) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 85:2444, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Paquete de Software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineamiento manual e inspección visual (véase, p. ej., Brent et al., (2003) *Current Protocols in Molecular Biology*).

25

30

35

Dos ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al., (1977) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402; y Altschul et al., (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410, respectivamente. El software para llevar a cabo los análisis de BLAST es de dominio público y se puede acceder a él a través del *National Center for Biotechnology Information*.

40

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos también se puede determinar utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller, (1988) *Comput. Appl. Biosci.* 4:11-17) que ha sido incorporado al programa ALIGN (versión 2.0), utilizando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 444-453) que ha sido incorporado al programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en www.gcg.com), utilizando una matriz Blossom 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

45

50

Dominio transmembrana

Con respecto al dominio transmembrana, en diversas realizaciones, un CAR puede diseñarse para comprender un dominio transmembrana que está unido al dominio extracelular del CAR. Un dominio transmembrana puede incluir uno o más aminoácidos adicionales adyacentes a la región de transmembrana, p. ej., uno o más aminoácidos asociados con la región extracelular de la proteína de la que se derivó la transmembrana (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 hasta 15 aminoácidos de la región extracelular) y/o uno o más aminoácidos adicionales asociados con la región intracelular de la proteína de la cual se deriva la proteína de la transmembrana (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 hasta 15 aminoácidos de la región intracelular). En un aspecto, el dominio transmembrana es uno que está asociado con uno de los otros dominios del CAR que se utiliza. En algunos casos, el dominio transmembrana se puede seleccionar o modificar por sustitución de aminoácidos para evitar la unión de dichos dominios a los dominios transmembrana de las mismas o diferentes proteínas de la membrana superficial, p. ej., para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor. En un aspecto, el dominio transmembrana es capaz de homodimerizarse con otro CAR en la superficie de la célula CART. En

55

60

un aspecto diferente, la secuencia de aminoácidos del dominio transmembrana puede modificarse o sustituirse con el fin de minimizar las interacciones con los dominios de unión del participante en la unión nativo presente en la misma CART.

El dominio transmembrana puede derivarse de una fuente natural o recombinante. Cuando la fuente es natural, el dominio puede derivarse de cualquier proteína unida a la membrana o de la transmembrana. En un aspecto, el dominio transmembrana es capaz de señalizar el o los dominios intracelulares cada vez que el CAR se ha unido a una diana. Un dominio transmembrana de uso particular en esta invención puede incluir al menos la o las regiones de transmembrana de, p. ej., la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154.

En algunos casos, el dominio transmembrana se puede unir a la región extracelular del CAR, p. ej., el dominio de unión al antígeno del CAR, a través de una bisagra, p. ej., una bisagra de una proteína humana. Por ejemplo, en una realización, la bisagra puede ser una bisagra de Ig (inmunoglobulina) humana, p. ej., una bisagra de IgG4 o una bisagra de CD8a. En una realización, la bisagra o el espaciador comprende (p. ej., consiste en) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. En un aspecto, el dominio transmembrana comprende (p. ej., consiste en) un dominio transmembrana de SEQ ID NO: 15.

En un aspecto, la bisagra o el espaciador comprende una bisagra de IgG4. Por ejemplo, en una realización, la bisagra o el espaciador comprende una bisagra de la secuencia de aminoácidos ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVSFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGKM (SEQ ID NO: 104). En algunas realizaciones, la bisagra o el espaciador comprende una bisagra codificada por una secuencia de nucleótidos de

GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCCTTGCCCTGCCCCGAGTTCCTGGGCGG
 ACCCAGCGTGTTCTGTTCCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGA
 CCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCCGAGGTCCA
 GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGG
 GAGGAGCAGTTCAATAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCA
 GGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCC
 AGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGG
 TGTACACCCTGCCCCCTAGCCAAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAC
 CTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAC
 GGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCA
 GCTTCTTCCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAGGGCAA
 CGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGA
 GCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATG (SEQ ID NO:105).

En un aspecto, la bisagra o el espaciador comprende una bisagra de IgD. Por ejemplo, en una realización, la bisagra o el espaciador comprende una bisagra de la secuencia de aminoácidos RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGLAKATTAPATTRNTGRGEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAV QDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPS LPPQRLMALREPAAQAPVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTF WAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVSHEDSRTLLNASRSLEVSIVTDH (SEQ ID NO: 106). En algunas realizaciones, la bisagra o el espaciador comprende una bisagra codificada por una secuencia de nucleótidos de

AGGTGGCCCCGAAAGTCCCAAGGCCCAGGCATCTAGTGTTCTACTGCACAGCCCCA
 GGCAGAAGGCAGCCTAGCCAAAGCTACTACTGCACCTGCCACTACGCGCAATACT
 5 GGCCGTGGCGGGGAGGAGAAGAAAAAGGAGAAAGAGAAAGAAGAACAGGAAGA
 GAGGGAGACCAAGACCCCTGAATGTCCATCCCATACCCAGCCGCTGGGCGTCTATC
 TCTTGAATCCCAGTACAGGACTTGTGGCTTAGAGATAAGGCCACCTTTACATGT
 10 TTCGTCTGGGCTCTGACCTGAAGGATGCCCATTGACTTGGGAGGTTGCCGAAA
 GGTACCCACAGGGGGGTTGAGGAAGGGTTGCTGGAGCGCCATTCCAATGGCTCT
 CAGAGCCAGCACTCAAGACTCACCTTCCGAGATCCCTGTGGAACGCCGGGACCTC
 15 TGTCACATGTACTCTAAATCATCCTAGCCTGCCCCACAGCGTCTGATGGCCCTTAG
 AGAGCCAGCCGCCCAGGCACCAGTTAAGCTTAGCCTGAATCTGCTCGCCAGTAGTG
 ATCCCCCAGAGGCCGCCAGCTGGCTCTTATGCGAAGTGTCGGCTTTAGCCCGCCC
 20 AACATCTTGCTCATGTGGCTGGAGGACCAGCGAGAAGTGAACACCAGCGGCTTCG
 CTCCAGCCCGGCCCCACCCAGCCGGGTTCTACCACATTCTGGGCCTGGAGTGTC
 TTAAGGGTCCCAGCACCACTAGCCCCAGCCAGCCACATACACCTGTGTTGTGTC
 25 CCATGAAGATAGCAGGACCCTGCTAAATGCTTCTAGGAGTCTGGAGGTTTCTACG
 TGACTGACCATT (SEQ ID NO:107).

En un aspecto, el dominio transmembrana puede ser recombinante, en cuyo caso comprenderá predominantemente
 30 residuos hidrofóbicos, tales como leucina y valina. En un aspecto, se puede encontrar un triplete de fenilalanina, triptófano
 y valina en cada uno de los extremos de un dominio transmembrana recombinante.

Opcionalmente, un enlazador oligopéptido o polipéptido corto, p. ej., de entre 2 y 10 aminoácidos de longitud, puede
 35 formar el enlace entre el dominio transmembrana y la región citoplasmática del CAR. Un doblete de glicina-serina es un
 ejemplo de un enlazador adecuado. Por ejemplo, en un aspecto, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos
 de GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 108). En algunas realizaciones, el enlazador está codificado por una secuencia de
 nucleótidos de GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC (SEQ ID NO:109).

40 Dominio citoplasmático

El dominio citoplasmático o región del CAR incluye un dominio de señalización intracelular. Un dominio de señalización
 intracelular es generalmente responsable de la activación de al menos una de las funciones efectoras normales de la
 célula inmune en la que ha sido introducido el CAR. La expresión "función efectora" se refiere a una función especializada
 45 de una célula. La función efectora de una célula T, por ejemplo, puede ser actividad citolítica o actividad auxiliar, incluida
 la secreción de citoquinas. Por lo tanto, la expresión "dominio de señalización intracelular" se refiere a la porción de una
 proteína que transduce la señal de la función efectora y dirige a la célula para realizar una función especializada. Aunque
 generalmente se puede emplear todo el dominio de señalización intracelular, en muchos casos no es necesario utilizar la
 cadena completa. En la medida en que se utilice una porción truncada del dominio de señalización intracelular, dicha
 50 porción truncada se puede utilizar en lugar de la cadena intacta, siempre que transduzca la señal de la función efectora.
 La expresión dominio de señalización intracelular pretende, por lo tanto, incluir cualquier porción truncada del dominio de
 señalización intracelular suficiente para transducir la señal de función efectora.

Ejemplos de dominios de señalización intracelular para uso en el CAR de la invención incluyen las secuencias
 citoplasmáticas del receptor de células T (TCR) y co-receptores que actúan en concierto para iniciar la transducción de
 55 señales después de la activación del receptor de antígeno, así como cualquier derivado o variante de estas secuencias y
 cualquier secuencia recombinante que tenga la misma capacidad funcional.

Se sabe que las señales generadas a través del TCR solo son insuficientes para una activación completa de la célula T y
 que también se requiere una señal secundaria y/o co-estimulante. Por lo tanto, se puede decir que la activación de las
 60 células T está mediada por dos clases distintas de secuencias de señalización citoplasmáticas: las que inician la activación
 primaria dependiente del antígeno a través del TCR (dominios de señalización intracelular primaria) y las que actúan de
 manera independiente del antígeno para proporcionar una señal secundaria o co-estimulante (dominio de señalización
 citoplasmática secundaria, p. ej., un dominio co-estimulante).

Un dominio de señalización primario regula la activación primaria del complejo TCR, ya sea de manera estimulante o inhibidora. Dominios de señalización intracelular primario que actúan de manera estimulante pueden contener motivos de señalización que se conocen como motivos de activación basada en tirosina inmunorreceptores o ITAMs.

5 Ejemplos de dominios de señalización intracelular primarios que contienen ITAM que son de uso particular en la invención incluyen los de TCR zeta, FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. En una realización, un CAR de la invención, p. ej., un CAR de SEQ ID NO: 73, comprende un dominio de señalización intracelular, p. ej., un dominio de señalización primaria, de CD3-zeta. En una realización, un dominio de señalización primario comprende un dominio ITAM modificado, p. ej., un dominio ITAM mutado que tiene actividad alterada (p. ej., incrementada o disminuida) en comparación con el dominio ITAM nativo. En una realización, un dominio de señalización primario comprende un dominio de señalización intracelular primario que contiene ITAM modificado, p. ej., un dominio de señalización intracelular primario que contiene ITAM optimizado y/o truncado. En una realización, un dominio de señalización primario comprende uno, dos, tres, cuatro o más motivos ITAM.

15 El dominio de señalización intracelular del CAR puede comprender el dominio de señalización CD3-zeta por sí mismo o puede combinarse con cualquier otro(s) dominio(s) de señalización intracelular(es) deseado(s) útil(es) en el contexto de un CAR de la invención. Por ejemplo, el dominio de señalización intracelular del CAR puede comprender una porción de cadena CD3-zeta y un dominio de señalización co-estimulante. El dominio de señalización co-estimulante se refiere a una porción del CAR que comprende el dominio intracelular de una molécula co-estimulante. Una molécula co-estimulante es una molécula de la superficie celular distintas de un receptor de antígeno o sus ligandos que se requieren para una respuesta eficiente de linfocitos a un antígeno. Ejemplos de moléculas de este tipo incluyen CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno asociado a la función linfocítica-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, y un ligando que se une específicamente con CD83, y similares. Por ejemplo, se ha demostrado que la co-estimulación de CD27 potencia la expansión, la función efectora y la supervivencia de células CART humanas in vitro y aumenta la persistencia de células T humanas y la actividad antitumoral in vivo (Song et al. Blood. 2012; 119(3):696-706).

20 Las secuencias de señalización intracelular dentro de la porción citoplasmática de un CAR de la invención pueden enlazarse entre sí en un orden aleatorio o especificado. Opcionalmente, un enlazador oligopéptido o polipéptido corto, por ejemplo, entre 2 y 10 aminoácidos (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos) de longitud puede formar el enlace entre secuencia de señalización intracelular.

En una realización, se puede utilizar un doblete de glicina-serina como un enlazador adecuado. En una realización, se puede utilizar un solo aminoácido, p. ej., una alanina, una glicina, como un enlazador adecuado.

35 En un aspecto, el dominio de señalización intracelular está diseñado para comprender dos o más, p. ej., 2, 3, 4, 5 o más, dominios de señalización co-estimulantes. En una realización, los dos o más, p. ej., 2, 3, 4, 5 o más dominios de señalización co-estimulantes, están separados por una molécula de enlazador, p. ej., una molécula de enlazador descrita en esta memoria. En una realización, el dominio de señalización intracelular comprende dos dominios de señalización co-estimulantes. En algunas realizaciones, la molécula enlazadora es un residuo glicina. En algunas realizaciones, el enlazador es un residuo alanina.

40 En un aspecto, el dominio de señalización intracelular está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD28. En un aspecto, el dominio de señalización intracelular está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de 4-1BB. En un aspecto, el dominio de señalización de 4-1BB es un dominio de señalización de SEQ ID NO: 16. En un aspecto, el dominio de señalización de CD3-zeta es un dominio de señalización de SEQ ID NO: 17.

45 En un aspecto, el dominio de señalización intracelular está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD27. En un aspecto, el dominio de señalización de CD27 comprende una secuencia de aminoácidos de

50 QRRKYRSNKGESPVEPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP (SEQ ID NO: 102). En un aspecto, el dominio de señalización de CD27 es codificado por una secuencia de ácido nucleico de

55 AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCC
GCCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCA
GCCTATCGCTCC (SEQ ID NO:103).

60 En un aspecto, la célula que expresa CAR descrita en esta memoria puede comprender, además, un segundo CAR, p. ej., un segundo CAR que incluye un dominio de unión a antígeno diferente, p. ej., a la misma diana (EGFRvIII) o una diana diferente.

65

En otro aspecto, se proporciona una población de células que expresan CAR, p. ej., células CART. La población de células que expresan CAR puede comprender una mezcla de células que expresan diferentes CARs. Por ejemplo, la población de células CART puede incluir una primera célula que expresa un CAR que tiene un dominio de unión anti-EGFRvIII descrito en esta memoria, y una segunda célula que expresa un CAR que tiene un dominio de unión anti-EGFRvIII diferente, p. ej., un dominio de unión anti-EGFRvIII descrito en esta memoria que difiere del dominio de unión anti-EGFRvIII en el CAR expresado por la primera célula. Como otro ejemplo, la población de células que expresan CAR puede incluir una primera célula que expresa un CAR que incluye un dominio de unión anti-EGFRvIII, p. ej., tal como se describe en esta memoria, y una segunda célula que expresa un CAR que incluye un dominio de unión a antígeno a una diana distinta de EGFRvIII. En otro ejemplo, la población de células que expresan CAR incluye, p. ej., una primera célula que expresa un CAR que incluye un dominio de señalización intracelular primario, y una segunda célula que expresa un CAR que incluye un dominio de señalización secundario.

En otro aspecto, se describe una población de células en la que al menos una célula de la población expresa un CAR que tiene un dominio anti-EGFRvIII descrito en esta memoria, y una segunda célula que expresa otro agente, p. ej., un agente que potencia la actividad de una célula que expresa CAR. Por ejemplo, el agente puede ser un agente que inhibe una molécula inhibidora. Moléculas inhibidoras, p. ej., PD1, pueden disminuir la capacidad de una célula que expresa CAR de montar una respuesta efectora inmune. Ejemplos de moléculas inhibidoras incluyen PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 y TGFR beta.

20 Transfección de ARN

Se describen en esta memoria métodos para producir un ARN de CAR transcrito in vitro. Un constructo de ARN que codifica CAR se puede transfectar directamente en una célula. Un método para generar ARNm para su uso en la transfección puede implicar la transcripción in vitro (IVT) de un molde con cebadores especialmente diseñados, seguido de la adición de políA, para producir una construcción que contiene la secuencia no traducida 3' y 5' ("UTR"), un remate 5' y/o un Sitio Interno de Entrada al Ribosoma (IRES), el ácido nucleico que se ha de expresar y una cola de políA, típicamente de 50-2000 bases de longitud (SEQ ID NO: 116). El ARN así producido puede transfectar eficientemente diferentes tipos de células. En un aspecto, el molde incluye secuencias para el CAR.

En un aspecto, el CAR EGFRvIII es codificado por un ARN mensajero (ARNm). En un aspecto, el ARNm que codifica el CAR EGFRvIII se introduce en una célula T para la producción de una célula CART.

En una realización, el ARN de CAR transcrito in vitro puede introducirse en una célula como una forma de transfección transitoria. El ARN se produce por transcripción in vitro utilizando un molde generado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El ADN de interés de cualquier fuente puede convertirse directamente por PCR en un molde para la síntesis de ARNm in vitro utilizando cebadores apropiados y ARN polimerasa. La fuente del ADN puede ser, por ejemplo, ADN genómico, ADN plasmídico, ADN de fago, ADNc, secuencia de ADN sintético o cualquier otra fuente apropiada de ADN. El molde deseado para la transcripción in vitro es un CAR de la presente invención. Por ejemplo, el molde para el ARN CAR comprende una región extracelular que comprende un dominio variable de cadena sencilla de un anticuerpo antitumoral; una región de bisagra, un dominio transmembrana (p. ej., un dominio transmembrana de CD8a); y una región citoplasmática que incluye un dominio de señalización intracelular, p. ej., que comprende el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de 4-1BB.

En una realización, el ADN a utilizar para la PCR contiene un marco de lectura abierto. El ADN puede ser de una secuencia de ADN que se produce de forma natural a partir del genoma de un organismo. En una realización, el ácido nucleico puede incluir algunas o todas las regiones 5' y/o 3' no traducidas (UTRs). El ácido nucleico puede incluir exones e intrones. En una realización, el ADN a utilizar para la PCR es una secuencia de ácido nucleico humano. En otra realización, el ADN a utilizar para la PCR es una secuencia de ácido nucleico humano que incluye las UTRs 5' y 3'. El ADN puede ser alternativamente una secuencia de ADN artificial que normalmente no se expresa en un organismo que se produce de forma natural. Una secuencia de ADN artificial a modo de ejemplo es aquella que contiene porciones de genes que están ligadas para formar un marco de lectura abierto que codifica una proteína de fusión. Las porciones de ADN que están ligadas juntas pueden proceder de un solo organismo o de más de un organismo.

La PCR se utiliza para generar un molde para la transcripción in vitro de ARNm que se utiliza para la transfección. Métodos para realizar la PCR son bien conocidos en la técnica. Los cebadores para uso en la PCR están diseñados para tener regiones que son sustancialmente complementarias a las regiones del ADN a utilizar como un molde para la PCR. "Sustancialmente complementarias", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a secuencias de nucleótidos en las que una mayoría o todas las bases en la secuencia del cebador son complementarias, o una o más bases no son complementarias o están emparejadas erróneamente. Las secuencias sustancialmente complementarias son capaces de reasociarse o hibridarse con la diana de ADN pretendida en condiciones de reasociación utilizadas para la PCR. Los cebadores pueden diseñarse para ser sustancialmente complementarios a cualquier parte del molde de ADN. Por ejemplo, los cebadores pueden diseñarse para amplificar la porción de un ácido nucleico que normalmente se transcribe en las células (el marco de lectura abierto), incluidos las UTRs 5' y 3'. Los cebadores también pueden diseñarse para amplificar una porción de un ácido nucleico que codifica un dominio particular de interés. En una realización, los cebadores están diseñados para amplificar la región codificante de un ADNc humano, que incluye todas o porciones de las UTRs 5' y 3'.

- Cebadores útiles para la PCR pueden generarse mediante métodos sintéticos que son bien conocidos en la técnica. Los "cebadores directos" son cebadores que contienen una región de nucleótidos que son sustancialmente complementarios a nucleótidos en el molde de ADN que están aguas arriba de la secuencia de ADN que se ha de amplificar. "Aguas arriba" se utiliza en esta memoria para referirse a una ubicación 5' a la secuencia de ADN a amplificar con respecto a la cadena codificante. Los "cebadores inversos" son cebadores que contienen una región de nucleótidos que son sustancialmente complementarios a nucleótidos en el molde de ADN de doble cadena que están aguas abajo de la secuencia de ADN que se ha de amplificar. "Aguas abajo" se utiliza en esta memoria para referirse a una ubicación 3' a la secuencia de ADN a amplificar con respecto a la cadena codificante.
- Se puede utilizar cualquier ADN polimerasa útil para la PCR en los métodos descritos en esta memoria. Los reactivos y la polimerasa están disponibles comercialmente de un cierto número de fuentes.
- Se pueden utilizar también estructuras químicas con la capacidad de fomentar la estabilidad y/o la eficiencia de la traducción. El ARN tiene preferiblemente UTRs 5' y 3'. En una realización, la UTR 5' tiene una longitud de entre uno y 3000 nucleótidos. La longitud de las secuencias de UTR 5' y 3' a añadir a la región codificante se puede alterar mediante diferentes métodos, que incluyen, pero no se limitan al diseño de cebadores para PCR que se reasocian a diferentes regiones de las UTRs. Utilizando este enfoque, un experto ordinario en la técnica puede modificar las longitudes de las UTRs 5' y 3' requeridas para lograr una eficiencia de traducción óptima después de la transfección del ARN transcrito.
- Las UTRs 5' y 3' pueden ser las UTRs 5' y 3' endógenas que se producen de forma natural para el ácido nucleico de interés. Alternativamente, las secuencias UTR que no son endógenas al ácido nucleico de interés pueden añadirse incorporando las secuencias UTR en los cebadores directo e inverso o mediante cualesquiera otras modificaciones del molde. El uso de secuencias UTR que no son endógenas al ácido nucleico de interés puede ser útil para modificar la estabilidad y/o la eficiencia de traducción del ARN. Por ejemplo, se sabe que elementos ricos en AU en las secuencias UTR 3' pueden disminuir la estabilidad del ARNm. Por lo tanto, se pueden seleccionar o diseñar UTRs 3' para aumentar la estabilidad del ARN transcrito en base a las propiedades de los UTRs que son bien conocidos en la técnica.
- En una realización, la UTR 5' puede contener la secuencia Kozak del ácido nucleico endógeno. Alternativamente, cuando se añade una UTR 5' que no es endógena al ácido nucleico de interés por PCR tal como se describe arriba, se puede rediseñar una secuencia Kozak consenso añadiendo la secuencia UTR 5'. Las secuencias de Kozak pueden aumentar la eficiencia de la traducción de algunas transcripciones de ARN, pero no parece ser necesario para todos los ARN para permitir una traducción eficiente. El requisito para las secuencias de Kozak para muchos ARNm es conocido en la técnica. En otras realizaciones, la UTR 5' puede ser una UTR 5' de un virus de ARN, cuyo genoma de ARN es estable en las células. En otras realizaciones, se pueden utilizar diversos análogos de nucleótidos en la UTR 3' o 5' para impedir la degradación por exonucleasa del ARNm.
- Para permitir la síntesis de ARN a partir de un molde de ADN sin la necesidad de clonación génica, se debe unir un promotor de la transcripción al molde de ADN aguas arriba de la secuencia a transcribir. Cuando una secuencia que funciona como un promotor para una ARN polimerasa se añade al extremo 5' del cebador directo, el promotor de ARN polimerasa se incorpora al producto de PCR aguas arriba del marco de lectura abierto que se ha de transcribir. En una realización preferida, el promotor es un promotor de polimerasa T7, tal como se describe en otra parte de esta memoria. Otros promotores útiles incluyen, pero no se limitan a promotores de ARN polimerasa T3 y SP6. Las secuencias de nucleótidos de consenso para los promotores T7, T3 y SP6 son conocidas en la técnica.
- En una realización preferida, el ARNm tiene tanto un remate en el extremo 5' como una cola de poli(A) 3' que determina la unión al ribosoma, el inicio de la traducción y la estabilidad del ARNm en la célula. En un molde de ADN circular, por ejemplo, ADN plasmídico, la ARN polimerasa produce un producto concatamérico largo que no es adecuado para la expresión en células eucariotas. La transcripción del ADN plasmídico linealizado en el extremo de la UTR 3' da como resultado un ARNm de tamaño normal que no es eficaz en la transfección eucariota, incluso si se poliadenila después de la transcripción.
- En un molde de ADN lineal, la ARN polimerasa del fago T7 puede extender el extremo 3' de la transcripción más allá de la última base del molde (Schenborn y Mierendorf, Nuc Acids Res., 13:6223-36 (1985); Nacheva y Berzal-Herranz, Eur. J. Biochem., 270:1485-65 (2003)).
- El método convencional de integración de estiramientos de poliA/T en un molde de ADN es la clonación molecular. Sin embargo, la secuencia poliA/T integrada en el ADN plasmídico puede provocar inestabilidad plasmídica, que es por lo que los moldes de ADN plasmídico obtenidos de células bacterianas están altamente contaminados a menudo con deleciones y otras aberraciones. Esto hace que los procedimientos de clonación no solo sean laboriosos y lentos, sino que a menudo no sean fiables. Es por eso que un método que permite la construcción de moldes de ADN con estiramiento de poliA/T 3' sin clonación es altamente deseable.
- El segmento poliA/T del molde de ADN transcripcional se puede producir durante la PCR mediante el uso de un cebador inverso que contiene una cola poliT, tal como la cola 100T (SEQ ID NO: 117) (el tamaño puede ser 50-5000 T (SEQ ID NO: 118)), o después de la PCR por cualquier otro método, incluidos, pero no limitados a ligamiento de ADN o

recombinación in vitro. Las colas de poli(A) también proporcionan estabilidad a los ARNs y reducen su degradación. Generalmente, la longitud de una cola de poli(A) se correlaciona positivamente con la estabilidad del ARN transcrito. En una realización, la cola de poli(A) está entre 100 y 5000 adenosinas (SEQ ID NO 119).

5 Las colas de poli(A) de ARNs pueden extenderse aún más después de la transcripción in vitro con el uso de una poli(A) polimerasa, tal como la poliA polimerasa de *E. coli* (E-PAP). En una realización, aumentar la longitud de una cola de poli(A) de 100 nucleótidos a entre 300 y 400 nucleótidos (SEQ ID NO: 120) da como resultado un aumento de aproximadamente dos veces en la eficiencia de traducción del ARN. Adicionalmente, la unión de diferentes grupos químicos al extremo 3' puede aumentar la estabilidad del ARNm. Una unión de este tipo puede contener nucleótidos modificados/artificiales, aptámeros y otros compuestos. Por ejemplo, los análogos de ATP se pueden incorporar en la cola de poli(A) utilizando poli(A) polimerasa. Análogos de ATP pueden aumentar adicionalmente la estabilidad del ARN.

10 Los remates 5' también proporcionan estabilidad a moléculas de ARN. En una realización preferida, los ARNs producidos por los métodos descritos en esta memoria incluyen un remate 5'. El remate 5' se proporciona utilizando técnicas conocidas en la técnica y descritas en esta memoria (Cougot, et al., Trends in Biochem. Sci., 29:436-444 (2001); Stepinski, et al., RNA, 7:1468-95 (2001); Elango, et al., Biochim. Biophys. Res. Commun., 330:958-966 (2005)).

15 Los ARNs producidos por los métodos descritos en esta memoria también pueden contener una secuencia de sitio de entrada al ribosoma interno (IRES). La secuencia del IRES puede ser cualquier secuencia viral, cromosómica o artificialmente diseñada que inicie la unión del ribosoma independiente del remate al ARNm y facilite el inicio de la traducción. Se pueden incluir cualesquiera solutos adecuados para la electroporación celular, que puede contener factores que faciliten la permeabilidad y la viabilidad celular, tales como azúcares, péptidos, lípidos, proteínas, antioxidantes y tensioactivos.

20 El ARN puede introducirse en células diana utilizando cualquiera de un cierto número de métodos diferentes, por ejemplo, métodos disponibles comercialmente que incluyen, pero no se limitan a electroporación (Amara Nucleofector-II (Amara Biosystems, Colonia, Alemania)), (ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, Mass.) o Gene Pulser II (BioRad, Denver, Colo.), Multiporator (Eppendorf, Hamburgo Alemania), la transfección mediada por liposomas catiónicos utilizando lipofección, encapsulación de polímeros, transfección mediada por péptidos o sistemas de suministro de partículas biolísticas, tales como "pistolas de genes" (véase, por ejemplo, Nishikawa, et al. Hum Gene Ther., 12 (8): 861 -70 (2001).

Construcciones de Ácido Nucleico que Codifican un CAR

25 Se describen moléculas de ácidos nucleicos que codifican una o más construcciones de CAR descritas en esta memoria. En un aspecto, la molécula de ácido nucleico se proporciona como una transcripción de ARN mensajero. En un aspecto, la molécula de ácido nucleico se proporciona como una construcción de ADN.

30 Se describe una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende un dominio de unión anti-EGFRvIII (p. ej., un dominio de unión anti-EGFRvIII humanizado), un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio estimulante, p. ej., un dominio de señalización co-estimulante y/o un dominio de señalización primario, p. ej., la cadena zeta. En un aspecto, el dominio de unión anti-EGFRvIII es un dominio de unión anti-EGFRvIII descrito en esta memoria, p. ej., un dominio de unión anti-EGFRvIII que comprende una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 74 y SEQ ID NO: 80, o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma. La molécula de ácido nucleico aislada puede comprender, además, una secuencia que codifica un dominio co-estimulante. El dominio co-estimulante puede ser un dominio de señalización funcional de una proteína seleccionada del grupo que consiste en OX40, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) y 4-1BB (CD137). El dominio co-estimulante puede comprender una secuencia de SEQ ID NO: 16, o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma. El dominio transmembrana puede ser un dominio transmembrana de una proteína seleccionada del grupo que consiste en la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 epsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD 137 y CD154. El dominio transmembrana puede comprender una secuencia de SEQ ID NO: 15, o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma. El dominio de señalización intracelular puede comprender un dominio de señalización funcional de 4-1BB y un dominio de señalización funcional de CD3 zeta. El dominio de señalización intracelular puede comprender la secuencia de SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 102 o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma, y la secuencia de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 99, o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma, en donde las secuencias que comprenden el dominio de señalización intracelular se expresan en el mismo marco y como una cadena polipeptídica única. El dominio de unión anti-EGFRvIII puede estar conectado al dominio transmembrana por una región de bisagra, p. ej., una bisagra descrita en esta memoria. La región de bisagra puede comprender SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 104 o SEQ ID NO: 106 o SEQ ID NO: 108, o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma.

35 Se describe una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una construcción de CAR que comprende una secuencia conductora de SEQ ID NO: 13, un dominio scFv que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 80 y SEQ ID NO: 86 (o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma), una región de bisagra de SEQ ID NO:.

14 o SEQ ID NO: 104 o SEQ ID NO: 106 o SEQ ID NO: 108 (o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma), un dominio transmembrana que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 15 (o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma), un dominio co-estimulante 4-1BB que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 16 o un dominio co-estimulante CD27 que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 102 (o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma), un dominio estimulante CD3-zeta que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 99 (o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma).

Se describe una molécula de polipéptido aislada codificada por la molécula de ácido nucleico. En un aspecto, la molécula de polipéptido aislado comprende una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 85, y SEQ ID NO: 90, o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma. El polipéptido aislado puede comprender una secuencia de SEQ ID NO: 73, o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma. Se describe un polipéptido aislado que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 79 o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma.

Se describe una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión anti-EGFRvIII, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio estimulante, y en donde dicho dominio de unión anti-EGFRvIII comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 80 y SEQ ID NO: 86 o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma.

La molécula de CAR codificada puede comprender, además, una secuencia que codifica un dominio co-estimulante. En una realización, el dominio co-estimulante es un dominio de señalización funcional de una proteína seleccionada del grupo que consiste en OX40, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18) y 4-1BB (CD137). En una realización, el dominio co-estimulante comprende una secuencia de SEQ ID NO: 16. En una realización, el dominio transmembrana es un dominio transmembrana de una proteína seleccionada del grupo que consiste en la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 y CD154. En una realización, el dominio transmembrana comprende una secuencia de SEQ ID NO: 15. En una realización, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización funcional de 4-1BB y un dominio de señalización funcional de zeta. En una realización, el dominio de señalización intracelular comprende la secuencia de SEQ ID NO: 16 y la secuencia de SEQ ID NO: 17, en donde las secuencias que comprenden el dominio de señalización intracelular se expresan en el mismo marco y como una cadena polipeptídica única. En una realización, el dominio de unión anti-EGFRvIII está conectado al dominio transmembrana por una región de bisagra. En una realización, la región de bisagra comprende SEQ ID NO: 14. En una realización, la región de bisagra comprende SEQ ID NO: 104 o SEQ ID NO: 106 o SEQ ID NO: 108.

Se describe una molécula de CAR codificada que comprende una secuencia conductora de SEQ ID NO: 13, un dominio scFv que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 80 y SEQ ID NO: 86, o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma, una región de bisagra de SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 104 o SEQ ID NO: 106 o SEQ ID NO: 108, un dominio transmembrana que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 15, un dominio co-estimulante 4-1BB que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 16 o un dominio co-estimulante CD27 que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 102 y un dominio estimulante CD3-zeta que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 99. En un aspecto, la molécula de CAR codificada comprende una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 85 y SEQ ID NO: 90, o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma. En una realización, la molécula de CAR codificada comprende una secuencia de SEQ ID NO: 73 o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma. En un aspecto, la molécula de CAR aislada comprende una secuencia de SEQ ID NO: 79 o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma.

Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las moléculas deseadas se pueden obtener utilizando métodos recombinantes conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, seleccionando colecciones de células que expresan el gen, derivando el gen de un vector que se sabe que incluye el mismo, o aislando directamente de células y tejidos que lo contienen, utilizando técnicas estándar. Alternativamente, el gen de interés puede producirse sintéticamente, en lugar de clonarse.

La presente invención también proporciona vectores en los que se inserta un ADN de la presente invención. Los vectores derivados de retrovirus tales como el lentivirus son herramientas adecuadas para lograr la transferencia génica a largo plazo, ya que permiten la integración estable a largo plazo de un transgen y su propagación en células hijas. Los vectores lentivirales tienen la ventaja añadida frente a los vectores derivados de onco-retrovirus, tales como los virus de la leucemia murina, en que pueden transducir células no proliferantes, tales como hepatocitos. También tienen la ventaja adicional de una baja inmunogenicidad.

En resumen, la expresión de ácidos nucleicos naturales o sintéticos que codifican los CARs se logran típicamente enlazando operativamente un ácido nucleico que codifica el polipéptido CAR o porciones del mismo a un promotor, e

incorporando la construcción en un vector de expresión. Los vectores pueden ser adecuados para la replicación y la integración en eucariotas. Vectores típicos de clonación contienen terminadores de la transcripción y la traducción, secuencias de iniciación y promotores útiles para la regulación de la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos deseada.

Las construcciones de expresión también se pueden utilizar para la inmunización de ácidos nucleicos y la terapia génica, utilizando protocolos de administración de genes estándar. Métodos para el suministro de genes son conocidos en la técnica. Véanse, p. ej., las patentes de EE.UU. N°s 5.399.346, 5.580.859, 5.589.466. En otra realización, el vector es un vector de terapia génica.

El ácido nucleico se puede clonar en un cierto número de tipos de vectores. Por ejemplo, el ácido nucleico se puede clonar en un vector que incluye, pero no se limita a un plásmido, un fagémido, un derivado de fago, un virus animal y un cósmido. Vectores de particular interés incluyen vectores de expresión, vectores de replicación, vectores de generación de sondas y vectores de secuenciación.

Además, el vector de expresión se puede proporcionar a una célula en forma de un vector viral. La tecnología de vectores virales es bien conocida en la técnica y se describe, por ejemplo, en Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York), y en otros manuales de virología y biología molecular. Virus, que son útiles como vectores incluyen, pero no se limitan a retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados, virus herpes y lentivirus. En general, un vector adecuado contiene un origen de replicación funcional en al menos un organismo, una secuencia promotora, sitios de endonucleasa de restricción convenientes y uno o más marcadores seleccionables (p. ej., documentos WO 01/96584; WO 01/29058; y patente de EE.UU. N° 6.326.193).

Se ha desarrollado un cierto número de sistemas basados en virus para la transferencia de genes a células de mamíferos. Por ejemplo, los retrovirus proporcionan una plataforma conveniente para los sistemas de suministro de genes. Un gen seleccionado puede insertarse en un vector y empaquetarse en partículas retrovirales utilizando técnicas conocidas en la técnica. El virus recombinante se puede aislar y suministrar a las células del sujeto ya sea in vivo o ex vivo. Se conoce un cierto número de sistemas retrovirales en la técnica. En algunas realizaciones, se utilizan vectores de adenovirus. Se conoce un cierto número de vectores de adenovirus en la técnica. En una realización, se utilizan vectores de lentivirus.

Elementos promotores adicionales, p. ej., potenciadores, regulan la frecuencia de la iniciación transcripcional. Típicamente, estos se encuentran en la región 30-110 pb aguas arriba del sitio de inicio, aunque recientemente se ha demostrado que asimismo un cierto número de promotores contienen elementos funcionales aguas abajo del sitio de inicio. El espacio entre los elementos promotores con frecuencia es flexible, de modo que la función del promotor se conserva cuando los elementos se invierten o se mueven uno con respecto al otro. En el promotor de timidina quinasa (tk), el espacio entre los elementos del promotor se puede aumentar a 50 pb de separación antes de que la actividad comience a disminuir. Dependiendo del promotor, parece ser que los elementos individuales pueden funcionar de manera cooperativa o independiente para activar la transcripción.

Un ejemplo de un promotor adecuado es la secuencia promotora del citomegalovirus temprano inmediato (CMV). Esta secuencia promotora es una secuencia promotora constitutiva fuerte capaz de impulsar altos niveles de expresión de cualquier secuencia polinucleotídica enlazada operativamente a la misma. Otro ejemplo de un promotor adecuado es el Factor de Crecimiento por Elongación - 1 α (EF-1 α). Sin embargo, también se pueden utilizar otras secuencias promotoras constitutivas, que incluyen, pero no se limitan al promotor temprano del virus simio 40 (SV40), el virus del tumor mamario de ratón (MMTV), el promotor de repetición terminal larga (LTR) del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), el promotor MoMuLV, un promotor del virus de la leucemia aviar, un promotor temprano inmediato del virus de Epstein-Barr, un promotor del virus del sarcoma de Rous, así como promotores de genes humanos, tales como, pero no limitados al promotor de actina, el promotor de miosina, el promotor de hemoglobina y el promotor de creatina quinasa. Además, la invención no debe limitarse al uso de promotores constitutivos. Promotores inducibles también se contemplan como parte de la invención. El uso de un promotor inducible proporciona un interruptor molecular capaz de activar la expresión de la secuencia de polinucleótidos que está operativamente enlazada cuando se desea tal expresión, o capaz de apagar la expresión cuando no se desea la expresión. Ejemplos de promotores inducibles incluyen, pero no se limitan a un promotor de metalotionina, un promotor de glucocorticoides, un promotor de progesterona y un promotor de tetraciclina.

Con el fin de evaluar la expresión de un polipéptido CAR o porciones del mismo, el vector de expresión a introducir en una célula también puede contener un gen marcador seleccionable o un gen informador o ambos para facilitar la identificación y selección de células que se expresan a partir de la población de células buscada para ser transfectada o infectada a través de vectores virales. En otros aspectos, el marcador seleccionable puede transportarse en un trozo de ADN separado y utilizarse en un procedimiento de co-transfección. Tanto los marcadores seleccionables como los genes informadores pueden estar flanqueados con secuencias reguladoras apropiadas para permitir la expresión en las células huésped. Marcadores seleccionables útiles incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos, tales como neo y similares.

Los genes informadores se utilizan para identificar células potencialmente transfectadas y para evaluar la funcionalidad de secuencias reguladoras. En general, un gen informador es un gen que no está presente en o es expresado por el

organismo o tejido receptor y que codifica un polipéptido, cuya expresión se manifiesta por alguna propiedad fácilmente detectable, p. ej., actividad enzimática. La expresión del gen informador se analiza en un momento adecuado después de que el ADN se haya introducido en las células receptoras. Genes informadores adecuados pueden incluir genes que codifican luciferasa, beta-galactosidasa, cloranfenicol acetil transferasa, fosfatasa alcalina secretada o el gen de la proteína fluorescente verde (p. ej., Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82). Sistemas de expresión adecuados son bien conocidos y pueden prepararse utilizando técnicas conocidas u obtenerse comercialmente. En general, la construcción con la región 5' flanqueante mínima que muestra el nivel más alto de expresión del gen informador se identifica como el promotor. Dichas regiones promotoras pueden estar vinculadas a un gen informador y pueden utilizarse para evaluar a los agentes para la capacidad de modular la transcripción impulsada por el promotor.

Métodos para introducir y expresar genes en una célula son conocidos en la técnica. En el contexto de un vector de expresión, el vector puede introducirse fácilmente en una célula huésped, p. ej., células de mamífero, bacterianas, de levaduras o de insectos mediante cualquier método en la técnica. Por ejemplo, el vector de expresión se puede transferir a una célula huésped por medios físicos, químicos o biológicos.

Métodos físicos para introducir un polinucleótido en una célula huésped incluyen precipitación con fosfato de calcio, lipofección, bombardeo de partículas, microinyección, electroporación y similares. Métodos para producir células que comprenden vectores y/o ácidos nucleicos exógenos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York). Un método preferido para la introducción de un polinucleótido en una célula huésped es la transfección con fosfato de calcio.

Métodos biológicos para introducir un polinucleótido de interés en una célula huésped incluyen el uso de vectores de ADN y ARN. Los vectores virales, y especialmente los vectores retrovirales, se han convertido en el método más ampliamente utilizado para insertar genes en células de mamíferos, p. ej., seres humanos.

Se pueden derivar otros vectores virales a partir de lentivirus, poxvirus, virus herpes simplex I, adenovirus y virus adeno-asociados, y similares. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N^{os} 5.350.674 y 5.585.362.

Medios químicos para introducir un polinucleótido en una célula huésped incluyen sistemas de dispersión coloidal, tales como complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Un sistema coloidal a modo de ejemplo para su uso como vehículo de suministro in vitro e in vivo es un liposoma (p. ej., una vesícula de membrana artificial).

En el caso de que se utilice un sistema de suministro no viral, un vehículo de suministro a modo de ejemplo es una nanopartícula, p. ej., un liposoma u otro sistema de suministro adecuado de tamaño submicrométrico. Se contempla el uso de formulaciones lipídicas para la introducción de los ácidos nucleicos en una célula huésped (in vitro, ex vivo o in vivo). En otro aspecto, el ácido nucleico puede estar asociado con un lípido. El ácido nucleico asociado con un lípido puede estar encapsulado en el interior acuoso de un liposoma, intercalado dentro de la bicapa lipídica de un liposoma, unido a un liposoma a través de una molécula de enlace que está asociada tanto con el liposoma como con el oligonucleótido, atrapado en un liposoma, complejado con un liposoma, dispersado en una solución que contiene un lípido, mezclado con un lípido, combinado con un lípido, contenido como una suspensión en un lípido, contenido o complejado con una micela, o asociado de otra manera con un lípido. Las composiciones asociadas a lípidos, lípidos/ADN o lípidos/vectores de expresión no se limitan a una estructura particular en solución alguna. Por ejemplo, pueden estar presentes en una estructura bicapa, tal como micelas, o con una estructura "colapsada". También pueden simplemente intercalarse en una solución, posiblemente formando agregados que no son uniformes en tamaño o forma. Los lípidos son sustancias grasas que pueden ser lípidos que se producen de forma natural o sintéticos. Por ejemplo, los lípidos incluyen las gotitas grasas que se producen de forma natural en el citoplasma, así como la clase de compuestos que contienen hidrocarburos alifáticos de cadena larga y sus derivados, tales como ácidos grasos, alcoholes, aminas, amino-alcoholes y aldehídos.

Lípidos adecuados para su uso se pueden obtener de fuentes comerciales. Por ejemplo, se puede obtener dimiristil fosfatidilcolina ("DMPC") de Sigma, St. Louis, MO; fosfato de dicetilo ("DCP") se puede obtener de K & K Laboratories (Plainview, NY); colesterol ("Choi") se puede obtener de Biochemical-Behring; dimiristil fosfatidilglicerol ("DMPG") y otros lípidos se pueden obtener de Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL). Las soluciones de partida de lípidos en cloroformo o cloroformo/metanol se pueden almacenar a aproximadamente -20°C. El cloroformo se utiliza como el único disolvente, ya que se evapora más fácilmente que el metanol. "Liposoma" es un término genérico que abarca una diversidad de vehículos lipídicos simples y multilamelares formados por la generación de bicapas o agregados lipídicos encerrados. Los liposomas pueden caracterizarse por tener estructuras vesiculares con una membrana de bicapa de fosfolípidos y un medio acuoso interno. Los liposomas multilamelares tienen múltiples capas de lípidos separadas por un medio acuoso. Se forman espontáneamente cuando los fosfolípidos se suspenden en un exceso de solución acuosa. Los componentes lipídicos se reorganizan antes de la formación de estructuras cerradas y atrapan agua y solutos disueltos entre las bicapas lipídicas (Ghosh et al., 1991 Glycobiology 5: 505-10). Sin embargo, también se incluyen composiciones que tienen diferentes estructuras en solución que la estructura vesicular normal. Por ejemplo, los lípidos pueden asumir una estructura micelar o simplemente existir como agregados no uniformes de moléculas de lípidos. También se contemplan los complejos de lipofectamina-ácido nucleico.

Independientemente del método utilizado para introducir ácidos nucleicos exógenos en una célula huésped o de otra manera exponer una célula al inhibidor de la presente invención, con el fin de confirmar la presencia de la secuencia de ADN recombinante en la célula huésped, se puede realizar una diversidad de ensayos. Ensayos de este tipo incluyen, por ejemplo, ensayos "biológicos moleculares" bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como transferencia Southern y Northern, RT-PCR y PCR; ensayos "bioquímicos", tales como detectar la presencia o ausencia de un péptido particular, p. ej., por medios inmunológicos (ELISAs y borrones Western) o por ensayos descritos en esta memoria para identificar agentes que caen dentro del alcance de la invención.

La presente invención proporciona además un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica CAR de la invención. En un aspecto, un vector CAR se puede transducir directamente a una célula, p. ej., una célula T. En un aspecto, el vector es un vector de clonación o expresión, p. ej., un vector que incluye, pero no se limita a uno o más plásmidos (p. ej., plásmidos de expresión, vectores de clonación, minicírculos, minivectores, cromosomas dobles diminutos), construcciones de vectores retrovirales y lentivirales. En un aspecto, el vector es capaz de expresar la construcción CAR en células T de mamífero. En un aspecto, la célula T de mamífero es una célula T humana.

Fuentes de células T

Antes de la expansión y modificación genética, se obtiene una fuente de células T de un sujeto. El término "sujeto" pretende incluir organismos vivos en los que se puede provocar una respuesta inmune (p. ej., mamíferos). Ejemplos de sujetos incluyen seres humanos, perros, gatos, ratones, ratas y especies transgénicas de los mismos. Las células T se pueden obtener de un cierto número de fuentes, incluidas las células mononucleares de la sangre periférica, la médula ósea, tejido de los ganglios linfáticos, sangre del cordón umbilical, tejido del timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, derrame pleural, tejido del bazo y tumores. En determinados aspectos de la presente invención, se puede utilizar cualquier número de líneas de células T disponibles en la técnica. En determinados aspectos de la presente invención, las células T se pueden obtener de una unidad de sangre recogida de un sujeto utilizando cualquier número de técnicas conocidas por el experto en la materia, tal como la separación de Ficoll™. En un aspecto preferido, células de la sangre circulante de un individuo se obtienen por aféresis. El producto de aféresis típicamente contiene linfocitos, incluyendo células T, monocitos, granulocitos, células B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y plaquetas. En un aspecto, las células recogidas por aféresis pueden lavarse para eliminar la fracción de plasma y colocar las células en un tampón o medio apropiado para las etapas de procesamiento posteriores. En un aspecto de la invención, las células se lavan con solución salina tamponada con fosfato (PBS). En un aspecto alternativo, la solución de lavado carece de calcio y puede carecer de magnesio o puede carecer de muchos, si no todos, cationes divalentes. Las etapas de activación iniciales en ausencia de calcio pueden conducir a una activación magnificada. Como los expertos ordinarios en la técnica apreciarían fácilmente, una etapa de lavado se puede lograr mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, tal como utilizando una centrífuga semiautomática de "flujo continuo" (por ejemplo, el procesador de células Cobe 2991, el Baxter CytoMate o el Haemonetics Cell Saver 5) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después del lavado, las células se pueden resuspender en una diversidad de tampones biocompatibles, tales como, por ejemplo, PBS libre de Ca, libre de Mg, PlasmaLyte A u otra solución salina con o sin tampón. Alternativamente, los componentes indeseables de la muestra de aféresis se pueden separar y las células se resuspenden directamente en medios de cultivo.

En un aspecto, las células T se aíslan de linfocitos de la sangre periférica lisando los glóbulos rojos y agotando los monocitos, por ejemplo, mediante centrifugación a través de un gradiente PERCOLL™ o por elutriación centrífuga de contraflujo. Una subpoblación específica de células T, tales como las células T CD3+, CD28+, CD4+, CD8+, CD45RA+ y CD45RO+, puede aislarse adicionalmente mediante técnicas de selección positivas o negativas. Por ejemplo, en un aspecto, las células T se aíslan mediante incubación con perlas conjugadas con anti-CD3/anti-CD28 (p. ej., 3x28), tales como DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T, durante un período de tiempo suficiente para una selección positiva de las células T deseadas. En un aspecto, el período de tiempo es de aproximadamente 30 minutos. En un aspecto adicional, el período de tiempo varía de 30 minutos a 36 horas o más y todos los valores enteros entre ellos. En un aspecto adicional, el período de tiempo es de al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 horas. En aún otro aspecto preferido, el período de tiempo es de 10 a 24 horas. En un aspecto, el período de tiempo de incubación es de 24 horas. Se pueden utilizar tiempos de incubación más largos para aislar células T en cualquier situación en la que haya pocas células T en comparación con otros tipos de células, tal como aislar linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) del tejido tumoral o de individuos inmunocomprometidos. Además, el uso de tiempos de incubación más largos puede aumentar la eficiencia de captura de células T CD8+. Por lo tanto, simplemente acortando o alargando el tiempo en que se permite que las células T se unan a las perlas de CD3/CD28 y/o aumentando o disminuyendo la relación de perlas a células T (tal como se describe más adelante en esta memoria), se pueden seleccionar preferentemente subpoblaciones de células T a favor o en contra al inicio del cultivo o en otros momentos durante el proceso. Adicionalmente, al aumentar o disminuir la relación de anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28 en las perlas u otra superficie, las subpoblaciones de células T pueden seleccionarse preferentemente a favor o en contra al inicio del cultivo o en otros momentos deseados. El experto reconocería que también se pueden utilizar múltiples rondas de selección en el contexto de esta invención. En determinados aspectos, puede ser deseable realizar el procedimiento de selección y utilizar las células "no seleccionadas" en el proceso de activación y expansión. Las células "no seleccionadas" también pueden someterse a rondas adicionales de selección.

El enriquecimiento de una población de células T mediante selección negativa se puede lograr con una combinación de anticuerpos dirigidos a marcadores de superficie únicos para las células seleccionadas negativamente. Un método es la

clasificación y/o selección celular mediante inmunoadherencia magnética negativa o citometría de flujo que utiliza un cóctel de anticuerpos monoclonales dirigidos a marcadores de la superficie celular presentes en las células seleccionadas negativamente. Por ejemplo, para enriquecer las células CD4⁺ por selección negativa, un cóctel de anticuerpos monoclonales típicamente incluye anticuerpos contra CD14, CD20, CD11bb, CD16, HLA-DR y CD8. En determinados aspectos, puede ser deseable enriquecer o seleccionar positivamente las células T reguladoras que típicamente expresan CD4⁺, CD25⁺, CD62Lhi, GITR⁺ y FoxP3⁺. Alternativamente, en determinados aspectos, células T reguladoras se agotan por perlas anti-CD25 conjugadas u otros métodos de selección similares.

En una realización, se puede seleccionar una población de células T que expresa uno o más de IFN- γ , TNF α , IL-17A, IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF, IL-10, IL-13, granzima B y perforina, u otras moléculas apropiadas, p. ej., otras citoquinas. Métodos para el rastreo de la expresión celular se pueden determinar, p. ej., mediante los métodos descritos en la Publicación PCT N°: WO 2013/126712.

Para el aislamiento de una población de células deseada mediante selección positiva o negativa, se puede variar la concentración de células y la superficie (p. ej., partículas tales como perlas). En determinados aspectos, puede ser deseable disminuir significativamente el volumen en el que se mezclan juntas las perlas y las células (p. ej., aumento de la concentración de células), para garantizar el máximo contacto de las células y las perlas. Por ejemplo, en un aspecto, se utiliza una concentración de 2 billones de células/ml. En un aspecto, se utiliza una concentración de 1 billón de células/ml. En un aspecto adicional, se utilizan más de 100 millones de células/ml. En un aspecto adicional, se utiliza una concentración de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 millones de células/ml. En aún un aspecto, se utiliza una concentración de células de 75, 80, 85, 90, 95 o 100 millones de células/ml. En aspectos adicionales, se pueden utilizar concentraciones de 125 o 150 millones de células/ml. El uso de altas concentraciones puede dar como resultado un mayor rendimiento celular, activación celular y expansión celular. Además, el uso de altas concentraciones de células permite una captura más eficiente de las células que pueden expresar débilmente antígenos diana de interés, tales como células T CD28-negativas, o de muestras en las que hay muchas células tumorales presentes (p. ej., sangre leucémica, tejido tumoral, etc.).

Poblaciones de células de este tipo pueden tener valor terapéutico y serían deseables de obtener. Por ejemplo, el uso de una alta concentración de células permite una selección más eficiente de células T CD8⁺ que normalmente tienen una expresión de CD28 más débil.

En un aspecto relacionado, puede ser deseable utilizar concentraciones más bajas de células. Al diluir significativamente la mezcla de células T y la superficie (p. ej., partículas tales como perlas), se minimizan las interacciones entre las partículas y las células. Esto selecciona las células que expresan altas cantidades de antígenos deseados para unirse a las partículas. Por ejemplo, las células T CD4⁺ expresan niveles más altos de CD28 y se capturan de manera más eficiente que las células T CD8⁺ en concentraciones diluidas. En un aspecto, la concentración de células utilizada es 5×10^6 /ml. En otros aspectos, la concentración utilizada puede ser de aproximadamente 1×10^5 /ml a 1×10^6 /ml, y cualquier valor entero entremedias.

En otros aspectos, las células pueden incubarse en un rotador durante períodos de tiempo variables a velocidades variables a 2-10°C o a temperatura ambiente.

Las células T para estimulación también pueden congelarse después de una etapa de lavado. Sin desear estar limitados por la teoría, la etapa de congelación y descongelación posterior proporciona un producto más uniforme al separar granulocitos y, en cierta medida, monocitos en la población celular. Después de la etapa de lavado que separa el plasma y las plaquetas, las células pueden suspenderse en una solución de congelación. Si bien muchas soluciones y parámetros de congelación son conocidos en la técnica y serán útiles en este contexto, un método implica el uso de PBS que contiene DMSO al 20% y albúmina de suero humano al 8%, o medios de cultivo que contienen Dextrano 40 al 10% y Dextrosa al 5%, Albúmina de Suero Humano al 20% y DMSO al 7,5%, o Plasmalyte-A al 31,25%, Dextrosa al 5%, NaCl al 0,45%, Dextrano 40 al 10% y Dextrosa al 5%, Albúmina de Suero Humano al 20% y DMSO al 7,5% u otros medios de congelación celular adecuados que contienen, por ejemplo, Hespan y PlasmaLyte A, las células se congelan luego a -80°C a una tasa de 1° por minuto y se almacenan en la fase de vapor de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido. Se pueden utilizar otros métodos de congelación controlada, así como la congelación no controlada inmediatamente a -20°C o en nitrógeno líquido.

En determinados aspectos, las células crioconservadas se descongelan y se lavan tal como se describe en esta memoria y se deja reposar durante una hora a temperatura ambiente antes de la activación utilizando los métodos de la presente invención.

También se contempla en el contexto de la invención la recogida de muestras de sangre o producto de aféresis de un sujeto en un período de tiempo anterior al momento en que podrían necesitarse las células expandidas tal como se describe en esta memoria. Como tal, la fuente de las células a expandir se puede recoger en cualquier momento necesario, y las células deseadas, tales como las células T, se pueden aislar y congelar para su uso posterior en la terapia con células T para cualquier número de enfermedades o afecciones que se beneficiarían de terapia con células T, tales como las descritas en esta memoria. En un aspecto, se toma una muestra de sangre o una aféresis de un sujeto generalmente

sano. En determinados aspectos, se toma una muestra de sangre o una aféresis de un sujeto generalmente sano que está en riesgo de desarrollar una enfermedad, pero que aún no ha desarrollado una enfermedad, y las células de interés se aíslan y congelan para su uso posterior. En determinados aspectos, las células T pueden expandirse, congelarse y utilizarse en un momento posterior. En determinados aspectos, se recogen muestras de un paciente poco después del diagnóstico de una enfermedad particular tal como se describe en esta memoria, pero antes de cualquier tratamiento. En un aspecto adicional, las células se aíslan de una muestra de sangre o de una aféresis de un sujeto antes de cualquier número de modalidades de tratamiento relevantes, que incluyen, pero no se limitan al tratamiento con agentes, tales como natalizumab, efalizumab, agentes antivirales, quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos u otros agentes inmunosupresores, tales como CAMPATH, anticuerpos anti-CD3, citoxano, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228 e irradiación.

En un aspecto adicional de la presente invención, las células T se obtienen de un paciente directamente después del tratamiento que deja al sujeto con células T funcionales. A este respecto, se ha observado que después de determinados tratamientos contra el cáncer, en particular los tratamientos con fármacos que dañan el sistema inmunitario, poco después del tratamiento durante el período en que los pacientes normalmente se recuperarían del tratamiento, la calidad de las células T obtenidas puede ser óptima o mejorada por su capacidad de expandirse ex vivo. Del mismo modo, después de la manipulación ex vivo utilizando los métodos descritos en esta memoria, estas células pueden estar en un estado preferido para un injerto mejorado y una expansión in vivo. Por lo tanto, se contempla dentro del contexto de la presente invención recoger células de la sangre, incluyendo células T, células dendríticas u otras células del linaje hematopoyético, durante esta fase de recuperación. Además, en determinados aspectos, la movilización (por ejemplo, la movilización con GM-CSF) y los regímenes de acondicionamiento pueden utilizarse para crear una condición en un sujeto en el que se favorezca la repoblación, la recirculación, la regeneración y/o la expansión de tipos de células particulares, especialmente durante una ventana de tiempo definida después de la terapia. Los tipos ilustrativos de células incluyen células T, células B, células dendríticas y otras células del sistema inmunitario.

Activación y Expansión de Células T

Las células T pueden activarse y expandirse generalmente utilizando métodos tal como se describe, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. 6.352.694; 6.534.055; 6.905.680; 6.692.964; 5.858.358; 6.887.466; 6.905.681; 7.144.575; 7.067.318; 7.172.869; 7.232.566; 7.175.843; 5.883.223; 6.905.874; 6.797.514; 6.867.041; y la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N° 20060121005.

Generalmente, las células T de la invención pueden expandirse por contacto con una superficie que tiene unido un agente que estimula una señal asociada al complejo CD3/TCR y un ligando que estimula una molécula co-estimulante en la superficie de las células T. En particular, las poblaciones de células T pueden estimularse tal como se describe en esta memoria, tal como por contacto con un anticuerpo anti-CD3, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un anticuerpo anti-CD2 inmovilizado sobre una superficie, o por contacto con un activador de proteína quinasa C (p. ej., briostatina) junto con un ionóforo de calcio. Para la co-estimulación de una molécula accesoria en la superficie de las células T, se utiliza un ligando que se une a la molécula accesoria. Por ejemplo, una población de células T puede ponerse en contacto con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28, bajo condiciones apropiadas para estimular la proliferación de las células T. Para estimular la proliferación de células T CD4+ o células T CD8+, un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28. Ejemplos de un anticuerpo anti-CD28 que se puede utilizar incluyen 9.3, B-T3, XR-CD28 (Diacione, Besançon, Francia), al igual que otros métodos comúnmente conocidos en la técnica (Berg et al., Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Haanen et al., J. Exp. Med. 190(9):1319-1328, 1999; Garland et al., J. Immunol Meth. 227(1-2):53-63, 1999).

En determinados aspectos, la señal estimulante primaria y la señal co-estimulante para la célula T pueden proporcionarse mediante diferentes protocolos. Por ejemplo, los agentes que proporcionan cada una de las señales pueden estar en solución o acoplados a una superficie. Cuando están acoplados a una superficie, los agentes se pueden acoplar a la misma superficie (es decir, en formación "cis") o a superficies separadas (es decir, en formación "trans"). Alternativamente, un agente puede estar acoplado a una superficie y el otro agente en solución. En un aspecto, el agente que proporciona la señal co-estimulante está unido a una superficie celular y el agente que proporciona la señal de activación primaria está en solución o acoplado a una superficie. En determinados aspectos, ambos agentes pueden estar en solución. En un aspecto, los agentes pueden estar en forma soluble y luego reticularse a una superficie, tal como una célula que expresa receptores Fc o un anticuerpo u otro agente de unión que se unirá a los agentes. A este respecto, véase, por ejemplo, las Publicaciones de Solicitud de Patente de EE.UU. N°s 20040101519 y 20060034810 para células presentadoras de antígeno artificiales (aAPCs) que se contemplan para su uso en la activación y expansión de células T en la presente invención.

En un aspecto, los dos agentes se inmovilizan sobre perlas, ya sea en la misma perla, es decir, "cis" o a perlas separadas, es decir, "trans". A modo de ejemplo, el agente que proporciona la señal de activación primaria es un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo y el agente que proporciona la señal co-estimulante es un anticuerpo anti-CD28 o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y ambos agentes se co-inmovilizan en la misma perla en cantidades moleculares equivalentes. En un aspecto, se utiliza una relación 1:1 de cada uno de los anticuerpos unidos a las perlas

para la expansión de células T CD4+ y el crecimiento de células T. En determinados aspectos, se utiliza una relación de anticuerpos anti CD3:CD28 unidos a las perlas de manera que se observa un aumento en la expansión de células T en comparación con la expansión observada utilizando una relación de 1:1. En un aspecto particular, se observa un aumento de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 veces en comparación con la expansión observada utilizando una relación de 1:1. En un aspecto, la relación del anticuerpo CD3:CD28 unido a las perlas varía de 100:1 a 1:100 y todos los valores enteros entremedias. En un aspecto, se une más anticuerpo anti-CD28 a las partículas que el anticuerpo anti-CD3, es decir, la relación de CD3:CD28 es menor que uno. En determinados aspectos, la relación de anticuerpo anti CD28 a anticuerpo anti CD3 unido a las perlas es mayor que 2:1. En un aspecto particular, se utiliza una relación 1:100 CD3:CD28 de anticuerpo unido a perlas. En un aspecto, se utiliza una relación 1:75 CD3:CD28 de anticuerpo unido a perlas. En un aspecto adicional, se utiliza una relación 1:50 CD3:CD28 de anticuerpo unido a perlas. En un aspecto, se utiliza una relación 1:30 CD3:CD28 de anticuerpo unido a perlas. En un aspecto preferido, se utiliza una relación 1:10 CD3:CD28 de anticuerpo unido a perlas. En un aspecto, se utiliza una relación 1:3 CD3:CD28 de anticuerpo unido a las perlas. En aún un aspecto, se utiliza una relación 3:1 CD3:CD28 de anticuerpo unido a las perlas.

Relaciones de partículas a células de 1:500 a 500:1 y cualquier valor entero entremedias pueden utilizarse para estimular células T u otras células diana. Como los expertos ordinarios en la técnica pueden apreciar fácilmente, la relación de partículas a células puede depender del tamaño de partícula con relación a la célula diana. Por ejemplo, las perlas de pequeño tamaño solo pueden unir unas pocas células, mientras que las perlas más grandes pueden unir muchas. En determinados aspectos, la relación de células a partículas varía de 1:100 a 100:1 y cualquier valor entero entremedias, y en aspectos adicionales, la relación comprende 1:9 a 9:1 y también se puede utilizar cualquier valor entero entremedias para estimular las células T. La relación de partículas anti-CD3- y anti-CD28-acopladas a las células T que dan como resultado la estimulación de células T puede variar como se indicó arriba, sin embargo, determinados valores preferidos incluyen 1:100, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1 y 15:1, siendo una relación preferida de al menos 1:1 partículas por célula T. En un aspecto, se utiliza una relación de partículas a células de 1:1 o menor. En un aspecto particular, una relación de partículas:células preferida es 1:5. En aspectos adicionales, la relación de partículas a células puede variar dependiendo del día de estimulación. Por ejemplo, en un aspecto, la relación de partículas a células es de 1:1 a 10:1 el primer día y se añaden partículas adicionales a las células todos los días o día por medio a partir de entonces durante hasta 10 días, en las relaciones finales de 1:1 a 1:10 (basado en recuentos de células el día de la adición). En un aspecto particular, la relación de partículas a células es 1:1 el primer día de estimulación y se ajusta a 1:5 el tercer y quinto días de estimulación. En un aspecto, las partículas se añaden diariamente o día por medio a una relación final de 1:1 el primer día y de 1:5 el tercer y quinto días de estimulación. En un aspecto, la relación de partículas a células es 2:1 el primer día de estimulación y se ajusta a 1:10 el tercer y quinto días de estimulación. En un aspecto, las partículas se añaden sobre una base diaria o día por medio a una relación final de 1:1 el primer día y de 1:10 el tercer y quinto días de estimulación. Un experto en la técnica apreciará que una diversidad de otras relaciones pueden ser adecuadas para su uso en la presente invención. En particular, las relaciones variarán dependiendo del tamaño de partícula y del tamaño y tipo de célula. En un aspecto, las relaciones más típicas para el uso están en la vecindad de 1:1, 2:1 y 3:1 el primer día.

En otros aspectos, las células, tales como las células T, se combinan con perlas recubiertas con agente, las perlas y las células se separan posteriormente, y luego las células se cultivan. En un aspecto alternativo, antes del cultivo, las perlas y células recubiertas con agente no se separan, sino que se cultivan juntas. En un aspecto adicional, las perlas y las células se concentran primero mediante la aplicación de una fuerza, tal como una fuerza magnética, que da como resultado un ligamiento incrementado de los marcadores de la superficie celular, induciendo con ello la estimulación celular.

A modo de ejemplo, las proteínas de la superficie celular se pueden ligar permitiendo que perlas paramagnéticas a las que se unen anti-CD3 y anti-CD28 (perlas 3x28) entren en contacto con las células T. En un aspecto, las células (por ejemplo, 10^4 a 10^9 células T) y perlas (por ejemplo, perlas paramagnéticas DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T en una relación de 1:1) se combinan en un tampón, por ejemplo PBS (sin cationes divalentes tales como calcio y magnesio). Nuevamente, los expertos ordinarios en la técnica pueden apreciar fácilmente que se puede utilizar cualquier concentración celular. Por ejemplo, la célula diana puede ser muy rara en la muestra y comprender solo el 0,01% de la muestra o toda la muestra (es decir, 100%) puede comprender la célula diana de interés. Por consiguiente, cualquier número de células está dentro del contexto de la presente invención. En determinados aspectos, puede ser deseable disminuir significativamente el volumen en el que se mezclan juntas las partículas y las células (p. ej., aumento de la concentración de células), para garantizar el máximo contacto de las células y las partículas. Por ejemplo, en un aspecto, se utiliza una concentración de aproximadamente 2 billones de células/ml. En un aspecto, se utilizan más de 100 millones de células/ml. En un aspecto adicional, se utiliza una concentración de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 millones de células/ml. En aún un aspecto, se utiliza una concentración de células de 75, 80, 85, 90, 95 o 100 millones de células/ml. En aspectos adicionales, se pueden utilizar concentraciones de 125 o 150 millones de células/ml. El uso de altas concentraciones puede dar como resultado un mayor rendimiento celular, activación celular y expansión celular. Además, el uso de altas concentraciones celulares permite una captura más eficiente de las células que pueden expresar débilmente los antígenos diana de interés, tales como células T CD28-negativas. Poblaciones de células de este tipo pueden tener valor terapéutico y serían deseables para obtener determinados aspectos. Por ejemplo, el uso de una alta concentración de células permite una selección más eficiente de células T CD8+ que normalmente tienen una expresión de CD28 más débil.

En un aspecto, la mezcla puede cultivarse durante varias horas (aproximadamente 3 horas) a aproximadamente 14 días o cualquier valor entero por hora entremedias. En un aspecto, la mezcla se puede cultivar durante 21 días. En un aspecto, las perlas y las células T se cultivan juntas durante aproximadamente ocho días. En un aspecto, las perlas y las células T se cultivan juntas durante 2-3 días. También pueden desearse varios ciclos de estimulación, de modo que el tiempo de cultivo de las células T pueda ser de 60 días o más. Condiciones apropiadas para el cultivo de células T incluyen un medio apropiado (p. ej., Medio Mínimo Esencial o Medio RPMI 1640 o, X-vivo 15, (Lonza)) que puede contener factores necesarios para la proliferación y la viabilidad, incluido el suero (p. ej., suero bovino fetal o humano), interleuquina-2 (IL-2), insulina, IFN- γ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF β y TNF- α o cualquier otro aditivo para el crecimiento de células conocido por el experto. Otros aditivos para el crecimiento de células incluyen, pero no se limitan a tensioactivo, plasmanato y agentes reductores, tales como N-acetil-cisteína y 2-mercaptoetanol. Medios pueden incluir RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 15 y X-Vivo 20, Optimizer, con aminoácidos añadidos, piruvato de sodio y vitaminas, libres de suero o complementado con una cantidad apropiada de suero (o plasma) o un conjunto definido de hormonas, y/o una cantidad de citoquina(s) suficiente para el crecimiento y la expansión de células T. Los antibióticos, p. ej., penicilina y estreptomycin, se incluyen solo en cultivos experimentales, no en cultivos de células que se infunden en un sujeto. Las células diana se mantienen en condiciones necesarias para apoyar el crecimiento, por ejemplo una temperatura (p. ej., 37°C) y una atmósfera (p. ej., aire más 5% de CO₂) apropiadas.

Las células T que han sido expuestas a tiempos de estimulación variados pueden exhibir características diferentes. Por ejemplo, productos de células mononucleares de la sangre o de la sangre periférica aferesiada típicos tienen una población de células T auxiliares (TH, CD4+) que es mayor que la población de células T citotóxicas o supresoras (TC, CD8+). La expansión ex vivo de células T mediante la estimulación de receptores CD3 y CD28 produce una población de células T que antes de aproximadamente los días 8-9 consiste predominantemente en células TH, mientras que después de aproximadamente los días 8-9, la población de células T comprende una población cada vez mayor de células TC. Por consiguiente, dependiendo del propósito del tratamiento, puede ser ventajoso infundir un sujeto con una población de células T que comprende predominantemente células TH. De manera similar, si se ha aislado un subconjunto de células TC específicas para el antígeno, puede ser beneficioso expandir este subconjunto a un mayor grado.

Además, aparte de los marcadores CD4 y CD8, otros marcadores fenotípicos varían significativamente, pero en gran parte, de forma reproducible durante el curso del proceso de expansión celular. Por lo tanto, dicha reproducibilidad permite la capacidad de adaptar un producto de células T activado para fines específicos.

Una vez que se construye un CAR EGFRvIII, se pueden utilizar diversos ensayos para evaluar la actividad de la molécula, tales como, pero no limitados a la capacidad de expandir las células T después de la estimulación con antígeno, mantener la expansión de las células T en ausencia de re-estimulación y actividades anticancerígenas en modelos in vitro y animales apropiados. Ensayos para evaluar los efectos de un CAR EGFRvIII se describen con más detalle más adelante.

El análisis de transferencia Western de la expresión de CAR en células T primarias se puede utilizar para detectar la presencia de monómeros y dímeros. Véase, p. ej., Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8) 1453-1464 (2009). Muy brevemente, células T (mezcla 1:1 de células T CD4+ y CD8+) que expresan los CARs se expanden in vitro durante más de 10 días, seguido de lisis y SDS-PAGE en condiciones reductoras. CARs que contienen el dominio citoplasmático TCR- ζ de longitud completa y la cadena TCR- ζ endógena se detectan mediante transferencia Western utilizando un anticuerpo para la cadena TCR- ζ . Los mismos subconjuntos de células T se utilizan para el análisis SDS-PAGE en condiciones no reductoras para permitir la evaluación de la formación de dímeros covalentes.

La expansión in vitro de las células T CAR+ después de la estimulación con antígeno se puede medir mediante citometría de flujo. Por ejemplo, se estimula una mezcla de células T CD4+ y CD8+ con aAPCs α CD3/ α CD28, seguido de transducción con vectores lentivirales que expresan GFP bajo el control de los promotores a analizar. Promotores a modo de ejemplo incluyen el gen CMV IE, EF-1 α , ubiquitina C o promotores de fosfogliceroquinasa (PGK). La fluorescencia de GFP se evalúa el día 6 de cultivo en los subconjuntos de células T CD4+ y/o CD8+ mediante citometría de flujo. Véase, p. ej., Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8) 1453-1464 (2009). Alternativamente, una mezcla de células T CD4+ y CD8+ se estimula con perlas magnéticas recubiertas con α CD3/ α CD28 el día 0, y se transducen con CAR el día 1 utilizando un vector lentiviral bicistrónico que expresa CAR junto con eGFP utilizando una secuencia de omisión ribosómica 2A. Los cultivos se reestiman con células U-87 EGFRvIII+ (U-87-EGFRvIII), células U-87 de tipo salvaje (U-87 de tipo salvaje) o células K562 que expresan hCD32 y 4-1BBL en presencia de anticuerpos antiCD3 y anti-CD28 (K562 -BBL-3/28) después del lavado. Se añade IL-2 exógena a los cultivos día por medio a razón de 100 UI/ml. Las células T GFP+ se enumeran por citometría de flujo utilizando recuento basado en perlas. Véase, p. ej., Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8) 1453-1464 (2009).

Se puede medir también la expansión sostenida de células T CAR+ en ausencia de re-estimulación. Véase, p. ej., Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8) 1453-1464 (2009). En síntesis, el volumen medio de células T (fl) se mide el día 8 de cultivo utilizando un contador de partículas Coulter Multisizer III después de la estimulación con perlas magnéticas recubiertas con α CD3/ α CD28 el día 0, y la transducción con el CAR indicado el día 1.

La evaluación de la proliferación celular y la producción de citoquinas se ha descrito previamente, p. ej., en Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009). En síntesis, la evaluación de la proliferación mediada por CAR se realiza en

placas de microtitulación mezclando células T lavadas con células diana, tales como células U87MG, BHK o CHO que expresan EGFRvIII o EGFR de tipo salvaje (wt) o CD32 y CD137 (KT32-BBL) para una relación final de células T:células diana de 1:1. Anticuerpos monoclonales anti-CD3 (clon OKT3) y anti-CD28 (clon 9.3) se añaden a cultivos con células KT32-BBL para servir como un control positivo para estimular la proliferación de células T, ya que estas señales apoyan la expansión a largo plazo de células T CD8⁺ ex vivo. Las células T se enumeran en cultivos utilizando perlas fluorescentes CountBright™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) y citometría de flujo como lo describe el fabricante. Las células T CAR⁺ se identifican mediante la expresión de GFP utilizando células T que están diseñadas con vectores lentivirales que expresan CAR enlazado a eGFP-2A. Para las células T CAR⁺ que no expresan GFP, las células T CAR⁺ se detectan con proteína EGFRvIII recombinante biotinilada y un conjugado secundario de avidina-PE. La expresión de CD4⁺ y CD8⁺ en células T también se detecta simultáneamente con anticuerpos monoclonales específicos (BD Biosciences). Las mediciones de citoquinas se realizan en sobrenadantes recogidos 24 horas después de la re-estimulación utilizando el kit de matriz de perlas citométricas de citoquina TH1 / TH2 humana (BD Biosciences, San Diego, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La fluorescencia se evalúa utilizando un citómetro de flujo FACScalibur, y los datos se analizan de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La citotoxicidad se puede evaluar mediante un ensayo estándar de liberación de ⁵¹Cr. Véase, p. ej., Milone et al., Molecular Therapy 17(8) 1453-1464 (2009). En síntesis, células diana (células U87MG, BHK o CHO que expresan EGFRvIII o EGFR de tipo salvaje (wt) se cargan con ⁵¹Cr (como NaCrO₄, New England Nuclear, Boston, MA) a 37°C durante 2 horas con agitación frecuente, se lavan dos veces en RPMI completo y se extienden en placas de microtitulación. Las células T efectoras se mezclan con las células diana en los pocillos en RPMI completo en relaciones variables de células efectoras:células diana (E:T). También se preparan pocillos adicionales que contienen medios solamente (liberación espontánea, SR) o una solución al 1% de detergente triton-X 100 (liberación total, TR). Después de 4 horas de incubación a 37°C, se recoge el sobrenadante de cada uno de los pocillos. El ⁵¹Cr liberado se mide luego utilizando un contador de partículas gamma (Packard Instrument Co., Waltham, MA). Cada una de las condiciones se realiza al menos por triplicado, y el porcentaje de lisis se calcula utilizando la fórmula: % de lisis = (ER-SR) / (TR - SR), en que ER representa el ⁵¹Cr medio liberado para cada una de las condiciones experimentales. También se pueden utilizar ensayos de citotoxicidad alternativos, tales como ensayos de citotoxicidad basados en flujo, tal como se describe en el Ejemplo 8.

La luciferasa de escarabajo clic rojo y escarabajo clic verde puede utilizarse para seguir simultáneamente la progresión del tumor y el tráfico de células T, ya que cada uno usa el mismo sustrato de luciferina, pero emite luz en los extremos opuestos del espectro de luz visible.

Otros ensayos, incluidos los descritos en la sección de Ejemplos de esta memoria, así como los que se conocen en la técnica, también se pueden utilizar para evaluar las construcciones CAR EGFRvIII de la invención.

35 Aplicación Terapéutica para EGFRvIII que Expresa Enfermedades y Trastornos

EGFRvIII es una variante constitutivamente activa del receptor epidérmico del factor de crecimiento epidérmico, específica para el tumor, independiente del ligando. La presente invención se refiere, por lo tanto, a composiciones y métodos para tratar enfermedades y trastornos asociados con EGFRvIII. Un ejemplo de una enfermedad o trastorno asociado con EGFRvIII es glioma.

Glioma se refiere a un cáncer del sistema nervioso central que comienza en las células gliales (p. ej., células que rodean y soportan las células nerviosas e incluye oligodendrocitos, astrocitos, microglia y células ependimarias). Los gliomas son particularmente graves en términos tanto de incidencia como de neoplasia, y se clasifican en siete o más tipos, tales como el glioblastoma y el astrocitoma anaplásico, de acuerdo con su tipo de tejido patológico detallado. El estadio de la enfermedad (tamaño del tumor, presencia de metástasis distal) y la neoplasia histológica se utilizan para determinar el grado de neoplasia de los tumores del cerebro primarios. La neoplasia histológica se clasifica en cuatro niveles, es decir, G1 a G4 de acuerdo con las Directrices para el Tratamiento de Tumores Cerebrales ((2002) Kanehara & Co., Ltd.), y estos corresponden a OMS1 a OMS4, respectivamente. Cuanto mayor sea el número, mayor será el grado de neoplasia. Por ejemplo, la neoplasia del glioblastoma es G4 (OMS4), mientras que la neoplasia del astrocitoma anaplásico es G3 (OMS3), y tanto G3 como G4 se clasifican como malignos. Por lo tanto, de acuerdo con algunas realizaciones, la diana es gliomas malignos. En otros aspectos, el glioblastoma multiforme (GBM) es una diana. En realizaciones adicionales, las composiciones de la presente invención pueden utilizarse en el tratamiento de otros gliomas que incluyen, pero no se limitan a astrocitoma anaplásico, glioblastoma de células gigantes, gliosarcoma, oligodendroglioma anaplásico, ependimoma anaplásico, carcinoma de plexo coroideo, ganglioglioma anaplásico, pineoblastoma, meduloeptelioma, ependimoblastoma, meduloblastoma, tumor neuroectodérmico primitivo supratentorial y tumor teratoideo/rabdoideo atípico.

El glioblastoma es el tumor cerebral primario más común en adultos. Más de la mitad de los 18.000 pacientes diagnosticados con tumores cerebrales primarios malignos en EE.UU. cada año tienen glioblastoma multiforme. El glioblastoma multiforme es un tumor anaplásico, altamente celular, con altos índices de proliferación, proliferación microvascular y necrosis focal. Los signos y síntomas dependen de varios factores (tamaño, tasa de crecimiento, localización del tumor dentro del cerebro) y están representados principalmente por dolor de cabeza, convulsiones, déficits neurológicos, cambios en el estado mental. El pronóstico del glioblastoma multiforme sigue siendo desalentador. El tiempo

de supervivencia es inferior a 2 años para la mayoría de los pacientes. El estado funcional de Karnofsky (KPS) es uno de los factores de pronóstico más importantes: pacientes con KPS > 70 están vivos a los 18 meses en aproximadamente el 18% de los casos, en comparación con el 13% de pacientes con puntuaciones KPS más bajas. El glioblastoma multiforme primario se desarrolla de novo a partir de células gliales, generalmente tiene un historial clínico de menos de seis meses, es más común en pacientes de edad avanzada y presenta histología de células pequeñas. El glioblastoma multiforme secundario se desarrolla durante meses o años a partir de astrocitomas pre-existentes de bajo grado, afecta predominantemente a personas más jóvenes y presenta histología de células gigantes.

Los gliomas malignos también se conocen como gliomas de alto grado. Pueden afectar el cerebro y la médula espinal. En algunos aspectos, las composiciones de la presente invención pueden utilizarse para tratar sujetos que portan un glioma maligno cerebral, por ejemplo, uno que se elige entre astrocitoma anaplásico (AA), glioblastoma multiforme (GBM), oligodendroglioma anaplásico (AO) y oligoastrocitoma anaplásico (AOA). En algunos aspectos, las composiciones de la presente invención pueden utilizarse para tratar sujetos que portan un glioblastoma multiforme (GBM).

El glioblastoma multiforme es la etapa más maligna del astrocitoma, con tiempos de supervivencia de menos de 2 años para la mayoría de los pacientes. Histológicamente, estos tumores se caracterizan por altos índices de proliferación, proliferación endotelial y necrosis focal. La naturaleza altamente proliferativa de estas lesiones probablemente sea el resultado de múltiples efectos mitogénicos. Una de las características de GBM es la proliferación endotelial. Una gran cantidad de factores de crecimiento angiogénico y sus receptores se encuentran en GBMs.

Existen subconjuntos biológicos de astrocitomas, que pueden reflejar la heterogeneidad clínica observada en estos tumores. Estos subconjuntos incluyen gliomas del tronco encefálico, que son una forma de astrocitoma fibrilar difuso pediátrico que a menudo sigue un curso maligno. Los GBMs del tronco encefálico comparten características genéticas con aquellos GBMs adultos que afectan a pacientes más jóvenes. El xantoastrocitoma pleiomórfico (PXA) es un tumor astrocítico superficial de bajo grado que afecta predominantemente a adultos jóvenes. Si bien estos tumores tienen una apariencia histológica extraña, típicamente son tumores de crecimiento lento que pueden ser susceptibles de cura quirúrgica. Sin embargo, algunos PXA pueden repetirse como GBM. El astrocitoma pilocítico es el tumor astrocítico más común de la infancia y difiere clínica e histopatológicamente del astrocitoma fibrilar difuso que afecta a los adultos. Los astrocitomas pilocíticos no tienen las mismas alteraciones genómicas que los astrocitomas fibrilares difusos. Los astrocitomas de células gigantes subependimarias (SEGA) son tumores astrocíticos periventriculares de bajo grado que habitualmente están asociados con la esclerosis tuberosa (TS) y son histológicamente idénticos a los llamados "canalones de vela" que recubren los ventrículos de los pacientes con TS. De manera similar a las otras lesiones tumorales en TS, éstas crecen lentamente y pueden ser más parecidas a hamartomas que a verdaderas neoplasias. El astrocitoma cerebral desmoplásico de la infancia (DCAI) y el ganglioglioma infantil desmoplásico (DIGG) son astrocitomas benignos grandes, superficiales, habitualmente quísticos, que afectan a los niños en el primer o segundo año de vida.

Los oligodendrogliomas y los oligoastrocitomas (gliomas mixtos) son tumores gliales difusos, principalmente del SNC, que están clínica y biológicamente más estrechamente relacionados con los astrocitomas fibrilares difusos. Los tumores, sin embargo, son mucho menos comunes que los astrocitomas y generalmente tienen mejores pronósticos que los astrocitomas difusos. Oligodendrogliomas y oligoastrocitomas pueden progresar, ya sea al oligodendroglioma anaplásico de grado III de la OMS o al oligoastrocitoma anaplásico, o al GBM grado IV de la OMS. Por lo tanto, los cambios genéticos que conducen a los tumores oligodendrogliales constituyen otra vía más hacia el GBM.

Los ependimomas son un grupo clínicamente diverso de gliomas que varían desde tumores intraventriculares agresivos de niños hasta tumores benignos de la médula espinal en adultos. Las transiciones de ependimoma a GBM son raras. Los tumores del plexo coroideo también son un grupo variado de tumores que ocurren preferentemente en el sistema ventricular, que varían desde tumores intraventriculares supratentoriales agresivos de niños hasta tumores benignos de ángulo cerebelopontino de adultos. Se han notificado ocasionalmente tumores del plexo coroideo en pacientes con síndrome de Li-Fraumeni y enfermedad de von Hippel-Lindau (VHL).

Los meduloblastomas son tumores malignos primitivos que surgen en la fosa posterior, principalmente en niños. Estos tumores también ocurren en adultos jóvenes. Los meduloblastomas a menudo se reseccionan quirúrgicamente con tratamiento posterior con quimioterapia y/o radiación. Pueden reaparecer local u ocasionalmente como bajada de metástasis de la fosa posterior a la columna vertebral. Los meningiomas son tumores intracraneales comunes que surgen en las meninges y comprimen el cerebro subyacente. Aunque típicamente se considera benigno y rara vez francamente maligno, la gestión de estos tumores a menudo plantea desafíos clínicos. Grados histológicos de los meningiomas varían con la mayoría benigna, grado I/IV de la OMS (82%); menos comúnmente atípico, OMS II/IV (15%); y con poca frecuencia se presentan como anaplásicos o malignos, grado III/IV de la OMS (3%).

Los schwannomas son tumores benignos que surgen en los nervios periféricos. Los schwannomas pueden surgir en los nervios craneales, particularmente en la porción vestibular del octavo nervio craneal (schwannomas vestibulares, neuromas acústicos) donde se presentan como masas angulares cerebelopontinas. Los hemangioblastomas son tumores de origen incierto que se componen de células endoteliales, pericitos y las llamadas células del estroma. Estos tumores benignos se presentan con mayor frecuencia en el cerebelo y la médula espinal de adultos jóvenes. Los hemangioblastomas múltiples son característicos de la enfermedad de von Hippel-Lindau (VHL). Los

hemangiopericitomas (HPCs) son tumores duros que pueden mostrar un comportamiento localmente agresivo y pueden hacer metástasis. La histogénesis del hemangiopericitoma de base dural (HPC) se ha debatido durante mucho tiempo, con algunos autores clasificándola como una entidad distinta y otros clasificándola como un subtipo de meningioma.

5 Los síntomas de los tumores cerebrales primarios y metastásicos a menudo dependen de la ubicación en el cerebro y del tamaño del tumor. Dado que diversas regiones del cerebro son responsables de funciones específicas, los síntomas clínicos variarán mucho. Los tumores en el lóbulo frontal del cerebro pueden provocar debilidad y parálisis, trastornos del estado de ánimo, dificultad para pensar, confusión y desorientación, y amplios cambios emocionales. Los tumores del lóbulo parietal pueden provocar convulsiones, entumecimiento o parálisis, dificultad para escribir a mano, incapacidad para realizar problemas matemáticos simples, dificultad con ciertos movimientos y pérdida del sentido del tacto. Los tumores en el lóbulo occipital pueden provocar pérdida de visión en la mitad de cada campo visual, alucinaciones visuales y convulsiones. Los tumores del lóbulo temporal pueden provocar convulsiones, trastornos perceptuales y espaciales y afasia receptiva. Si se produce un tumor en el cerebelo, la persona puede tener ataxia, pérdida de coordinación, dolores de cabeza y vómitos. Los tumores en el hipotálamo pueden provocar cambios emocionales y cambios en la percepción del calor y el frío. Además, los tumores hipotalámicos pueden afectar el crecimiento y la nutrición en los niños. Con la excepción del cerebelo, un tumor en un lado del cerebro provoca síntomas y deterioro en el lado opuesto del cuerpo.

Las composiciones de la presente invención pueden utilizarse para tratar a un sujeto que se ha caracterizado por tener células o tejidos que expresan EGFRvIII, o se sospecha que tiene células o tejidos que expresan EGFRvIII. Por ejemplo, los sujetos que se benefician del tratamiento de acuerdo con la invención incluyen sujetos con un glioma, o sujetos sospechosos de tener un glioma, por ejemplo, como se evidencia por la presencia de uno o más dolores de cabeza, náuseas y vómitos, convulsiones, pérdida de visión, dolor, debilidad, entumecimiento en las extremidades y/o trastornos de los nervios craneales como resultado del aumento de la presión intracraneal. En realizaciones particulares, el glioma que está siendo tratado es glioblastoma multiforme. De acuerdo con esta realización, el glioblastoma multiforme puede estar en el cerebro o la médula espinal.

También se describen métodos para inhibir la proliferación o reducir una población celular que expresa EGFRvIII, comprendiendo los métodos poner en contacto una población de células que comprende una célula que expresa EGFRvIII con una célula que expresa CAR descrita en esta memoria, p. ej., una célula T, que se une a la célula que expresa EGFRvIII. En un aspecto específico, se describen métodos para inhibir la proliferación o reducir la población de células cancerosas que expresan EGFRvIII, comprendiendo los métodos poner en contacto la población de células cancerosas que expresan EGFRvIII con la célula que expresa CAR de la invención descrita en esta memoria, p. ej., una célula T, que se une a la célula que expresa EGFRvIII. También se describen métodos para inhibir la proliferación o reducir la población de células cancerosas que expresan EGFRvIII, comprendiendo los métodos poner en contacto la población de células cancerosas que expresan EGFRvIII con una célula CART EGFRvIII de la invención que se une a la célula que expresa EGFRvIII. En determinadas realizaciones, la célula CART EGFRvIII de la invención reduce la cantidad, el número, la cantidad o el porcentaje de células y/o células cancerosas en al menos un 25%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 65%, al menos un 75%, al menos un 85%, al menos un 95% o al menos un 99% en un sujeto con glioma modelo animal u otro cáncer asociado con células que expresan EGFRvIII en relación con un control negativo. En un aspecto, el sujeto es un ser humano.

Se describen métodos para prevenir, tratar y/o gestionar un trastorno asociado con células que expresan EGFRvIII (p. ej., un glioblastoma), comprendiendo los métodos administrar a un sujeto que necesita una célula CART EGFRvIII descrita en esta memoria que se une a la célula que expresa EGFRvIII. En un aspecto, el sujeto es un ser humano.

Se describen métodos para prevenir la recaída del cáncer asociada con células que expresan EGFRvIII, comprendiendo los métodos administrar a un sujeto que necesita una célula CART EGFRvIII descrita en esta memoria que se une a la célula que expresa EGFRvIII. En otro aspecto, los métodos comprenden administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de una célula CART EGFRvIII descrita en esta memoria que se une a la célula que expresa EGFRvIII en combinación con una cantidad efectiva de otra terapia.

Se describe un vector que comprende un CAR EGFRvIII enlazado operativamente al promotor para la expresión en células T de mamíferos. En un aspecto, la invención proporciona una célula T recombinante que expresa el CAR EGFRvIII para su uso en el tratamiento de tumores que expresan EGFRvIII. La célula T recombinante que expresa el CAR anti-EGFRvIII se denomina CART EGFRvIII. En un aspecto, el CART EGFRvIII de la invención es capaz de poner en contacto una célula tumoral con al menos un CAR EGFRvIII de la invención expresado en su superficie de tal manera que el CART EGFRvIII se activa en respuesta al antígeno y la T CAR fija como objetivo la célula tumoral y se inhibe el crecimiento del tumor.

Se describe un método para inhibir el crecimiento de una célula tumoral que expresa EGFRvIII, que comprende poner en contacto la célula tumoral con una célula CAR T EGFRvIII descrita en esta memoria de modo que la CART se activa en respuesta al antígeno y fija como objetivo la célula cancerosa, en donde se inhibe el crecimiento del tumor. En un aspecto, el CART activada fija como objetivo y mata la célula cancerosa.

Se describe un método para tratar el cáncer en un sujeto. El método comprende administrar al sujeto una célula CAR T EGFRvIII descrita en esta memoria tal que el cáncer se trate en el sujeto. Un ejemplo de un cáncer que es tratable por la

célula CAR T EGFRvIII de la invención es un cáncer asociado con la expresión de EGFRvIII. En un aspecto, el cáncer asociado con la expresión de EGFRvIII es un glioblastoma.

En un aspecto, el cáncer asociado con EGFRvIII se selecciona del grupo que consiste en glioblastoma multiforme (GBM), astrocitoma anaplásico, glioblastoma de células gigantes, gliosarcoma, oligodendroglioma anaplásico, ependimoma anaplásico, carcinoma del plexo coroideo, ganglioglioma anaplásico, pineoblastoma, meduloepitelioma, ependimoblastoma, meduloblastoma, tumor neuroectodérmico primitivo supratentorial y tumor teratoideo/rabdoideo atípico, carcinomas de pulmón de células no pequeñas, de mama, próstata, ovario, carcinoma colorrectal y de vejiga y cualquier combinación de los mismos.

Se describe un tipo de terapia celular en la que células T se modifican genéticamente para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) y la célula CAR T se infunde a un receptor que lo necesita. La célula infundida es capaz de matar células tumorales en el receptor. En algunos aspectos, las células T modificadas con CAR son capaces de replicarse in vivo, dando como resultado una persistencia a largo plazo que puede conducir a un control del tumor sostenido. En diversos aspectos, las células T administradas al paciente, o su progenie, persisten en el paciente durante al menos cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, nueve meses, diez meses, once meses, doce meses, trece meses, catorce meses, quince meses, dieciséis meses, diecisiete meses, dieciocho meses, diecinueve meses, veinte meses, veintiún meses, veintidós meses, veintitrés meses, dos años, tres años, cuatro años o cinco años después de la administración de la célula T al paciente.

En un aspecto, las células T modificadas con CAR descritas en esta memoria pueden ser un tipo de vacuna para inmunización ex vivo y/o terapia in vivo en un mamífero. En un aspecto, el mamífero es un ser humano.

Con respecto a la inmunización ex vivo, al menos uno de lo siguiente ocurre in vitro antes de administrar la célula a un mamífero: i) expansión de las células, ii) introducción de un ácido nucleico que codifica un CAR en las células o iii) crioconservación de las células.

Los procedimientos ex vivo son bien conocidos en la técnica y se comentan más detalladamente más adelante. En síntesis, las células se aíslan de un mamífero (p. ej., un ser humano) y se modifican genéticamente (p. ej., transducidas o transfectadas in vitro) con un vector que expresa un CAR descrito en esta memoria. La célula modificada con CAR puede administrarse a un receptor mamífero para proporcionar un beneficio terapéutico. El receptor mamífero puede ser un ser humano y la célula modificada con CAR puede ser autóloga con respecto al receptor. Alternativamente, las células pueden ser alogénicas, singénicas o xenogénicas con respecto al receptor.

El procedimiento para la expansión ex vivo de células madre hematopoyéticas y células progenitoras se describe en la patente de EE.UU. N° 5.199.942, puede aplicarse a las células de la presente invención. Se conocen otros métodos adecuados en la técnica, por lo tanto, la presente invención no se limita a método particular alguno de expansión ex vivo de las células. En síntesis, el cultivo y la expansión ex vivo de células T comprende: (1) recolectar células madre hematopoyéticas CD34+ y células progenitoras de un mamífero a partir de la extracción de sangre periférica o explantes de médula ósea; y (2) expandir estas células ex vivo. Además de los factores de crecimiento celular descritos en la patente de EE.UU. N° 5.199.942, se pueden utilizar otros factores, tales como flt3-L, IL-1, IL-3 y ligando c-kit, para el cultivo y la expansión de las células.

Además de utilizar una vacuna basada en células en términos de inmunización ex vivo, se describen composiciones y métodos para la inmunización in vivo para provocar una respuesta inmune dirigida contra un antígeno en un paciente.

Generalmente, las células activadas y expandidas tal como se describe en esta memoria pueden utilizarse en el tratamiento y la prevención de enfermedades que surgen en individuos que están inmunocomprometidos. En particular, las células T modificadas con CAR de la invención se utilizan en el tratamiento de enfermedades, trastornos y afecciones asociados con la expresión de EGFRvIII. En determinados aspectos, las células de la invención se utilizan en el tratamiento de pacientes en riesgo de desarrollar enfermedades, trastornos y afecciones asociados con la expresión de EGFRvIII. En determinados aspectos, se describen métodos para el tratamiento o la prevención de enfermedades, trastornos y afecciones asociados con la expresión de EGFRvIII, que comprenden administrar a un sujeto que lo necesite, una cantidad terapéuticamente efectiva de las células T modificadas con CAR de la invención.

Las células T modificadas con CAR de la presente invención pueden administrarse solas o como una composición farmacéutica en combinación con diluyentes y/o con otros componentes, tales como IL-2 u otras citoquinas o poblaciones de células u otros tratamientos farmacológicos, p. ej., descritos en esta memoria.

Se describen métodos para inhibir la proliferación o reducir una población de células que expresa EGFRvIII, comprendiendo los métodos poner en contacto una población de células que comprende una célula que expresa EGFRvIII con una célula CART EGFRvIII descrita en esta memoria, que se une a la célula que expresa EGFRvIII. En un aspecto específico, se describen métodos para inhibir la proliferación o reducir la población de células cancerosas que expresan EGFRvIII, comprendiendo los métodos poner en contacto la población de células cancerosas que expresan EGFRvIII con una célula CART EGFRvIII descrita en esta memoria que se une a la célula que expresa EGFRvIII. En un aspecto, se

- describen métodos para inhibir la proliferación o reducir la población de células cancerosas que expresan EGFRvIII, comprendiendo los métodos poner en contacto la población de células cancerosas que expresan EGFRvIII con una célula CART EGFRvIII descrita en esta memoria que se une a la célula que expresa EGFRvIII. En determinados aspectos, la célula CART EGFRvIII de la invención reduce la cantidad, el número, la cantidad o el porcentaje de células y/o células cancerosas en al menos un 25%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 65%, al menos un 75%, al menos un 85%, al menos un 95% o al menos un 99% en un sujeto con o modelo animal para glioma u otro cáncer asociado con células que expresan EGFRvIII en relación con un control negativo. En un aspecto, el sujeto es un ser humano.
- Se describen métodos para prevenir, tratar y/o gestionar una enfermedad asociada con células que expresan EGFRvIII (p. ej., un glioblastoma), comprendiendo los métodos administrar a un sujeto que necesita una célula CART EGFRvIII descrita en esta memoria que se une a la célula que expresa EGFRvIII. En un aspecto, el sujeto es un ser humano.
- Se describen métodos para prevenir la recaída del cáncer asociada con células que expresan EGFRvIII, comprendiendo los métodos administrar a un sujeto que necesita una célula CART EGFRvIII descrita en esta memoria que se une a la célula que expresa EGFRvIII. En un aspecto, los métodos comprenden administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de una célula CART EGFRvIII descrita en esta memoria que se une a la célula que expresa EGFRvIII en combinación con una cantidad efectiva de otra terapia.
- Terapias de Combinación**
- Una célula que expresa CAR, descrita en esta memoria, puede utilizarse en combinación con otros agentes y terapias conocidos. Administrado "en combinación", tal como se utiliza en esta memoria, significa que dos (o más) tratamientos diferentes se administran al sujeto durante el curso de la afección del sujeto con el trastorno, p. ej., los dos o más tratamientos se administran después de que el sujeto haya sido diagnosticado con el trastorno y antes de que el trastorno haya sido curado o eliminado o el tratamiento haya cesado por otras razones. En algunas realizaciones, el suministro de un tratamiento todavía ocurre cuando comienza el suministro del segundo, de modo que hay una superposición en términos de administración. Esto a veces se denomina en esta memoria "suministro simultáneo" o "suministro concurrente". En otras realizaciones, el suministro de un tratamiento finaliza antes de que comience el suministro del otro tratamiento. En algunas realizaciones de cualquier caso, el tratamiento es más efectivo debido a la administración combinada. Por ejemplo, el segundo tratamiento es más efectivo, p. ej., se observa un efecto equivalente con menos del segundo tratamiento, o el segundo tratamiento reduce los síntomas en mayor medida, de lo que se vería si el segundo tratamiento se administrara en ausencia del primer tratamiento, o se observa una situación análoga con el primer tratamiento. En algunas realizaciones, el suministro es tal que la reducción en un síntoma u otro parámetro relacionado con el trastorno es mayor de lo que se observaría con un tratamiento administrado en ausencia del otro. El efecto de los dos tratamientos puede ser parcialmente aditivo, totalmente aditivo o mayor que aditivo. El suministro puede ser tal que un efecto del primer tratamiento suministrado aún sea detectable cuando se suministra el segundo.
- Una célula que expresa CAR descrita en esta memoria y el al menos un agente terapéutico adicional se pueden administrar simultáneamente, en las mismas composiciones o en composiciones separadas, o secuencialmente. Para la administración secuencial, la célula que expresa el CAR descrita en esta memoria puede administrarse primero, y el agente adicional puede administrarse en segundo lugar, o el orden de administración puede invertirse.
- En aspectos adicionales, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria puede utilizarse en un régimen de tratamiento en combinación con cirugía, quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos u otros agentes inmunoaditivos, tales como CAMPATH, anticuerpos anti-CD3 u otras terapias de anticuerpos, citoxina, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228, citoquinas e irradiación. Se describen enfoques de inmunoterapia a modo de ejemplo para el glioma maligno en Johnson et al. 2010 Curr Neurol Neurosci Rep 10:259-266. En algunos aspectos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria puede utilizarse en un régimen de tratamiento en combinación, un agente fija como objetivo proteínas de la matriz extracelular, tales como la tensina, p. ej., un anticuerpo anti-tenascina, p. ej., un anticuerpo anti-tenascina marcado con ²¹¹At. En algunos aspectos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria puede utilizarse en un régimen de tratamiento en combinación con un agente inmunomodulador, tal como interferón alfa, interferón beta, inhibidor de péptido TGF-β2 o poli-ICLC. En algunos aspectos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria puede utilizarse en un régimen de tratamiento en combinación con una vacuna de péptido con factor de transcripción WT1, tal como la descrita en Izumoto et al. 2008 J Neurosurg 108:963-971.
- En un aspecto, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria puede utilizarse en combinación con un agente quimioterapéutico. Agentes quimioterapéuticos a modo de ejemplo incluyen un agente alquilante, un agente basado en platino, un inhibidor de la angiogénesis (p. ej., un inhibidor de la vía VEGF, un inhibidor de la tirosina quinasa (p. ej., un inhibidor de la vía EGF), un inhibidor de mTOR.
- Agentes quimioterapéuticos generales considerados para uso en terapias de combinación incluyen anastrozol (Arimidex®), bicalutamida (Casodex®), sulfato de bleomicina (Blenoxane®), busulfan (Myleran®), busulfan inyección (Busulfex®), capecitabina (Xeloda®), N4-pentoxicarbonil-5-desoxi-5-fluorocitidina, carboplatino (Paraplatin®), carmustina

(BiCNU®), clorambucilo (Leukeran®), cisplatino (Platinol®), cladribina (Leustatin®), ciclofosfamida (Cytoxan® o Neosar®), citarabina, citosina arabinósido (Cytosar-U®), inyección de liposoma de citarabina (DepoCyt®), dacarbazina (DTIC-Dome®), dactinomicina (Actinomicina D, Cosmegen), hidroclicloruro de daunorrubicina (Cerubidine®), inyección de liposoma de citrato de daunorrubicina (DaunoXome®), dexametasona, docetaxel (Taxotere®), hidroclicloruro de doxorubicina (Adriamycin®, Rubex®), etopósido (Vepesid®), fosfato de fludarabina (Fludara®), 5-fluorouracilo (Aduvix®, Efudex®), flutamida (Eulexin®), tezacitibina, Gemcitabina (difluorodesoxicidina), hidroxiurea (Hydrea®), Idarubicina (Idamycin®), ifosfamida (IFEX®), irinotecan (Camptosar®), L-asparaginasa (ELSPAR®), leucovorina calcio, melfalan (Alkeran®), 6-mercaptopurina (Purinethol®), metotrexato (Folex®), mitoxantrona (Novantrone®), milotarg, paclitaxel (Taxol®), phoenix (Yttrium90/MX-DTPA), pentostatina, polifeprosan 20 con implante de carmustina (Gliadel®), citrato de tamoxifen (Nolvadex®), tenipósido (Vumon®), 6-tioguanina, tiotepa, tirapazamina (Tirazone®), hidroclicloruro de topotecan para inyección (Hycamptin®), vinblastina (Velban®), vincristina (Oncovin®) y vinorelbina (Navelbine®).

Agentes alquilantes a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, mostazas nitrogenadas, derivados de etilenimina, alquil sulfonatos, nitrosoureas y triazenos: mostaza uracilo (Aminouracil Mustard®, Chlorethaminacil®, Demethyldopan®, Desmethyldopan®, Haemanthamine®, Nordopan®, Uracil nitrogen mustard®, Uracilost®, Uracilmustaza®, Uramustin®, Uramustine®), clormetina (Mustargen®), ciclofosfamida (Cytoxan®, Neosar®, Clafen®, Endoxan®, Procytox®, Revimmune™), ifosfamida (Mitoxana®), melfalan (Alkeran®), clorambucilo (Leukeran®), pipobromano (Amedel®, Vercyte®), trietilenomelamina (Hemel®, Hexalen®, Hexastat®), trietilenoftiofosforamina, Temozolomida (Temodar®), tiotepa (Thiopex®, busulfan (Busilvex®, Myleran®), carmustina (BiCNU®), lomustina (CeeNU®), estreptozocina (Zanosar®) y Dacarbazina (DTIC-Dome®). Agentes alquilantes a modo de ejemplo adicionales incluyen, sin limitación, Oxaliplatino (Eloxatin®); Temozolomida (Temodar® y Temodal®); Dactinomicina (también conocida como actinomicina-D, Cosmegen®); Melfalan (también conocido como L-PAM, L-sarcosina y mostaza fenilalanina, Alkeran®); Alretamina (también conocida como hexametilmelamina (HMM), Hexalen®); Carmustina (BiCNU®); Bendamustina (Treanda®); Busulfan (Busulfex® y Myleran®); Carboplatino (Paraplatin®); Lomustina (también conocida como CCNU, CeeNU®); Cisplatino (también conocido como CDDP, Platinol® y Platinol®-AQ); Clorambucilo (Leukeran®); Ciclofosfamida (Cytoxan® y Neosar®); Dacarbazina (también conocida como DTIC, DIC e imidazol carboxamida, DTIC-Dome®); Alretamina (también conocida como hexametilmelamina (HMM), Hexalen®); Ifosfamida (Ifex®); Prednimustina; Procarbazina (Matulane®); Mecloreteamina (también conocida como mostaza nitrogenada, mosto e hidroclicloruro de mecloroetamina, Mustargen®); Estreptozocina (Zanosar®); Tiotepa (también conocida como tiofosfoamida, TESP A y TSPA, Thiopex®); Ciclofosfamida (Endoxan®, Cytoxan®, Neosar®, Procytox®, Revimmune®); y bendamustina HCl (Treanda®).

Agentes basados en platino a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, carboplatino, cisplatino y oxaliplatino.

Inhibidores de angiogénesis a modo de ejemplo incluyen, sin limitación A6 (Angstrom Pharmaceuticals), ABT-510 (Abbott Laboratories), ABT-627 (Atrasentan) (Abbott Laboratories/Xinlay), ABT-869 (Abbott Laboratories), Actimid (CC4047, Pomalidomide) (Celgene Corporation), AdGVPEDF.11D (GenVec), ADH-1 (Exherin) (Adherex Technologies), AEE788 (Novartis), AG-013736 (Axitinib) (Pfizer), AG3340 (Prinomastat) (Agouron Pharmaceuticals), AGX1053 (AngioGenex), AGX51 (AngioGenex), ALN-VSP (ALN-VSP O2) (Alnylam Pharmaceuticals), AMG 386 (Amgen), AMG706 (Amgen), Apatinib (YN968D1) (Jiangsu Hengrui Medicine), AP23573 (Ridaforolimus/MK8669) (Ariad Pharmaceuticals), AQ4N (Novavea), ARQ 197 (ArQule), ASA404 (Novartis/Antisoma), Atiprimod (Callisto Pharmaceuticals), ATN-161 (Attenuon), AV-412 (Aveo Pharmaceuticals), AV-951 (Aveo Pharmaceuticals), Avastin (Bevacizumab) (Genentech), AZD2171 (Cediranib/Recentin) (AstraZeneca), BAY 57-9352 (Telatinib) (Bayer), BEZ235 (Novartis), BIBF1120 (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals), BIBW 2992 (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals), BMS-275291 (Bristol-Myers Squibb), BMS-582664 (Brivanib) (Bristol-Myers Squibb), BMS-690514 (Bristol-Myers Squibb), Calcitriol, CCI-779 (Torisel) (Wyeth), CDP-791 (ImClone Systems), Ceflatonin (Homoharringtonine/HHT) (ChemGenex Therapeutics), Celebrex (Celecoxib) (Pfizer), CEP-7055 (Cephalon/Sanofi), CHIR-265 (Chiron Corporation), NGR-TNF, COL-3 (Metastat) (Collagenex Pharmaceuticals), Combretastatina (Oxigene), CP-751,871 (Figitumumab) (Pfizer), CP-547,632 (Pfizer), CS-7017 (Daiichi Sankyo Pharma), CT -322 (Angiocept) (Adnexus), Curcumina, Dalteparina (Fragmin) (Pfizer), Disulfiram (Antabuse), E7820 (Eisai Limited), E7080 (Eisai Limited), EMD 121974 (Cilengitida) (EMD Pharmaceuticals), ENMD-1198 (EntreMed), ENMD-2076 (EntreMed), Endostar (Simcere), Erbitux (ImClone/Bristol-Myers Squibb), EZN-2208 (Enzon Pharmaceuticals), EZN-2968 (Enzon Pharmaceuticals), GC1008 (Genzyme), Genistein, GSK1363089 (Foretinib) (GlaxoSmithKline), GW786034 (Pazopanib) (GlaxoSmithKline), GT-111 (Vascular Biogenics Ltd.), IMC--1121B (Ramucirumab) (ImClone Systems), IMC-18F1 (ImClone Systems), IMC-3G3 (ImClone LLC), INCB007839 (Incyte Corporation), INGN 241 (Introgen Therapeutics), Iressa (ZD1839/Gefitinib), LBH589 (Faridak/Panobinostat) (Novartis), Lucentis (Ranibizumab) (Genentech/Novartis), LY317615 (Enzastaurin) (Eli Lilly and Company), Macugen (Pegaptanib) (Pfizer), MEDI522 (Abrigin) (MedImmune), MLN518 (Tandutinib) (Millennium), Neovastat (AE941/Benefin) (Aeterna Zentaris), Nexavar (Bayer/Onyx), NM-3 (Genzyme Corporation), Noscipina (Cougar Biotechnology), NPI-2358 (Nereus Pharmaceuticals), OSI-930 (OSI), Palomid 529 (Paloma Pharmaceuticals, Inc.), Panzem Cápsulas (2ME2) (EntreMed), Panzem NCD (2ME2) (EntreMed), PF-02341066 (Pfizer), PF-04554878 (Pfizer), PI-88 (Progen Industries/Medigen Biotechnology), PKC412 (Novartis), Polyphenon E (Green Tea Extract) (Polypheno E International, Inc), PPI-2458 (Praecis Pharmaceuticals), PTC299 (PTC Therapeutics), PTK787 (Vatalanib) (Novartis), PXD101 (Belinostat) (CuraGen Corporation), RAD001 (Everolimus) (Novartis), RAF265 (Novartis), Regorafenib (BAY73-4506) (Bayer), Revlimid (Celgene), Retaane (Alcon Research), SN38 (Liposomal) (Neopharm), SNS-032 (BMS-387032) (Sunesis), SOM230 (Pasireotide) (Novartis), Squalamina (Genaera), Suramin, Sutent (Pfizer), Tarceva (Genentech), TB-403 (Thrombogenics),

Tempostatín (Collard Biopharmaceuticals), Tetratiomolibdato (Sigma-Aldrich), TG100801 (TargeGen), Talidomida (Celgene Corporation), Tinzaparina Sódica, TKI258 (Novartis), TRC093 (Tracon Pharmaceuticals Inc.), VEGF Trap (Aflibercept) (Regeneron Pharmaceuticals), VEGF Trap-Eye (Regeneron Pharmaceuticals), Veglin (VasGene Therapeutics), Bortezomib (Millennium), XL184 (Exelixis), XL647 (Exelixis), XL784 (Exelixis), XL820 (Exelixis), XL999 (Exelixis), ZD6474 (AstraZeneca), Vorinostat (Merck) y ZSTK474.

Inhibidores del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitación, Bevacizumab (Avastin®), axitinib (Inlyta®); Brivanib alaninato (BMS-582664, (S)-((R)-1-(4-(4-fluoro-2-metil-1H-indol-5-iloxi)-5-metilpirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-6-iloxi)propan-2-il)2-aminopropanoato); Sorafenib (Nexavar®); Pazopanib (Votrient®); Sunitinib malato (Sutent®); Cediranib (AZD2171, CAS 288383-20-1); Vargatef (BIBF1120, CAS 928326-83-4); Foretinib (GSK1363089); Telatinib (BAY57-9352, CAS 332012-40-5); Apatinib (YN968D1, CAS 811803-05-1); Imatinib (Gleevec®); Ponatinib (AP24534, CAS 943319-70-8); Tivozanib (AV951, CAS 475108-18-0); Regorafenib (BAY73-4506, CAS 755037-03-7); Vatalanib dihidrocloruro (PTK787, CAS 212141-51-0); Brivanib (BMS-540215, CAS 649735-46-6); Vandetanib (Caprelsa® o AZD6474); Motesanib difosfato (AMG706, CAS 857876-30-3, N-(2,3-dihidro-3,3-dimetil-1H-indol-6-il)-2-[(4-piridinilmetil)amino]-3-piridinacarboxamida, descrita en la Publicación PCT N° WO 02/066470); Dovitinib ácido diláctico (TKI258, CAS 852433-84-2); Linfanib (ABT869, CAS 796967-16-3); Cabozantinib (XL184, CAS 849217-68-1); Lestaurtinib (CAS 111358-88-4); N-[5-[[[5-(1,1-dimetiletil)-2-oxazolil]metil]tio]-2-tiazolil]-4-piperidinacarboxamida (BMS38703, CAS 345627-80-7); (3R,4R)-4-amino-1-((4-((3-metoxifenil)amino)pirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-5-il)metil)piperidin-3-ol (BMS690514); N-(3,4-dicloro-2-fluorofenil)-6-metoxi-7-[(3α,5β,6α)-octahidro-2-metilciclopenta[c]pirrol-5-il]metoxi-4-quinazolinamina (XL647, CAS 781613-23-8); 4-metil-3-[[1-metil-6-(3-piridinil)-1H-pirazolo [3,4-d]pirimidin-4-il] amino]-N-[3-(trifluorometil)fenil]-benzamida (BHG712, CAS 940310-85-0); y Aflibercept (Eylea®).

Inhibidores a modo de ejemplo de la vía de EGF incluyen, sin limitación, tirfostin 46, EKB-569, erlotinib (Tarceva®), gefitinib (Iressa®), erbitux, nimotuzumab, lapatinib (Tykerb®), cetuximab (anti-EGFR mAb), nimotuzumab marcado con ¹⁸⁸Re (mAb anti-EGFR), y los compuestos que se describen genérica y específicamente en los documentos WO 97/02266, EP 0 564 409, WO 99/03854, EP 0 520 722, EP 0 566 226, EP 0 787 722, EP 0 837 063, US 5,747,498, WO 98/10767, WO 97/30034, WO 97/49688, WO 97/38983 y WO 96/33980. Anticuerpos de EGFR a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a Cetuximab (Erbix®); Panitumumab (Vectibix®); Matuzumab (EMD-72000); Trastuzumab (Herceptin®); Nimotuzumab (hR3); Zalutumumab; TheraCIM h-R3; MDX0447 (CAS 339151-96-1); y ch806 (mAb-806, CAS 946414-09-1). Inhibidores a modo de ejemplo del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) incluyen, pero no se limitan a, Erlotinib hidrocloreto (Tarceva®), Gefitinib (Iressa®); N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-7-[(3"S)-tetrahydro-3-furanil]oxil]-6-quinazolinil]-4(dimetilamino)-2-butenamida, Tovok®; Vandetanib (Caprelsa®); Lapatinib (Tykerb®); (3R,4R)-4-amino-1-((4-((3-metoxifenil)amino)pirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-5-il)metil)piperidin-3-ol (BMS690514); Canertinib dihidrocloruro (CI-1033); 6-[4-[(4-etil-1-piperazinil)metil]fenil]-N-[(1R)-1-feniletil]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-amina (AEE788, CAS 497839-62-0); Mubritinib (TAK165); Pelitinib (EKB569); Afatinib (BIBW2992); Neratinib (HKI-272); ácido N-[4-[[1-[(3-fluorofenil)metil]-1H-indazol-5-il]amino]-5-metilpirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-6-il]-carbámico, éster (3S)-3-morfolinilmetílico (BMS599626); N-(3,4-dicloro-2-fluorofenil)-6-metoxi-7-[(3α,5β,6α)-octahidro-2-metilciclopenta[c]pirrol-5-il]metoxi-4-quinazolinamina (XL647, CAS 781613-23-8); y 4-[4-[(1R)-1-feniletil]amino]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-6-il]-fenol (PKI166, CAS 187724-61-4).

Inhibidores de mTor a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, rapamicina (Rapamune®), y análogos y derivados de la misma; SDZ-RAD; Temsirolimus (Torisel®; también conocido como CCI-779); Ridaforolimus (anteriormente conocido como deferolimus, (dimetilfosfinato de 1R,2R,4S)-4-[(2R)-2-[(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-1,18-dihidroxi-19,30-dimetoxi-15,17,21,23,29,35-hexametil-2,3,10,14,20-pentaóxido-11,36-dioxo-4-azatriciclo[30.3.1.0^{4,9}] hexatriaconta-16,24,26,28-tetraen-12-il]propil]-2-metoxiciclohexilo, también conocido como AP23573 y MK8669, y descrito en la Publicación PCT N° WO 03/064383); Everolimus (Afinitor® o RAD001); Rapamycin (AY22989, Sirolimus®); Simapimod (CAS 164301-51-3); (5-{2,4-bis[(3S)-3-metilmorfolin-4-il]pirido[2,3-d]pirimidin-7-il}-2-metoxifenil)metanol (AZD8055); 2-amino-8-[trans-4-(2-hidroxietoxi)ciclohexil]-6-(6-metoxi-3-piridinil)-4-metil-pirido[2,3-d] pirimidin-7(8H)-ona (PF04691502, CAS 1013101-36-4); y N²-[1,4-dioxo-4-[[4-(4-oxo-8-fenil-4H-1-benzopiran-2-il)morfolinio-4-il]metoxi]butil]-L-arginilglicil-L-α-aspartil-L-serina-, sal interna (SF1126, CAS 936487-67-1).

Inhibidores a modo de ejemplo de fosfoinositida 3-quinasa (PI3K) incluyen, pero no se limitan a 4-[2-(1H-Indazol-4-il)-6-[[4-(metilsulfonil)piperazin-1-il]metil]tieno [3,2-d]pirimidin-4-il]morfolina (también conocida como GDC 0941 y descrita en las Publicaciones PCT N°s WO 09/036082 y WO 09/055730); 2-metil-2-[4-[3-metil-2-oxo-8-(quinolin-3-il)-2,3-dihidroimidazo[4,5-c]quinolin-1-il]fenil]propionitrilo (también conocido como BEZ 235 o NVP-BEZ 235, y descrito en la Publicación PCT N° WO 06/122806); 4-(trifluorometil)-5-(2,6-dimorfolinopirimidin-4-il)piridin-2-amina (también conocida como BKM120 o NVP-BKM120, y descrita en la Publicación PCT N° WO2007/084786); Tozasertib (VX680 o MK-0457, CAS 639089-54-6); (5Z)-5-[4-(4-piridinil)-6-quinolinil]metileno]-2,4-tiazolidinadiona (GSK1059615, CAS 958852-01-2); (1E,4S,4aR,5R,6aS,9aR)-5-(acetiloxi)-1-[(di-2-propenilamino)metileno]-4,4a,5,6,6a,8,9,9a-octahidro-11-hidroxi-4-(metoximetil)-4a,6a-dimetil-ciclopenta[5,6]nafto[1,2-c]piran-2,7,10(1H)-triona (PX866, CAS 502632-66-8); y 8-fenil-2-(morfolin-4-il)-cromen-4-ona (LY294002, CAS 154447-36-6). Inhibidores de la proteína quinasa B (PKB) o AKT a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a 8-[4-(1-aminociclobutil)fenil]-9-fenil-1,2,4-triazolo[3,4-f][1,6]naftiridin-3(2H)-ona (MK-2206, CAS 1032349-93-1); Perifosina (KRX0401); 4-dodecil-N-1,3,4-tiadiazol-2-il-bencenosulfonamida (PHT-427,

CAS 1191951-57-1); 4-[2-(4-amino-1,2,5-oxadiazol-3-il)-1-etil-7-[(3S)-3-piperidinilmetoxi]-1H-imidazo[4,5-c]piridin-4-il]-2-metil-3-buten-2-ol (GSK690693, CAS 937174-76-0); 8-(1-hidroxiethyl)-2-metoxi-3-[(4-metoxifenil)metoxi]-6H-dibenzo[b,d]piran-6-ona (palomid 529, P529 o SG-00529); Tricirbina (6-amino-4-metil-8-(β-D-ribofuranosil)-4H,8H-pirrol[4,3,2-de]pirimido[4,5-c]piridazina); (αS)-α-[[[5-(3-metil-1H-indazol-5-il)-3-piridinil]oxi]metil]-bencenoetanamina (A674563, CAS 552325-73-2); 4-[(4-clorofenil)metil]-1-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-4-piperidinamina (CCT128930, CAS 885499-61-6); 4-(4-clorofenil)-4-[4-(1H-pirazol-4-il)fenil]-piperidina (AT7867, CAS 857531-00-1); y Archexin (RX-0201, CAS 663232-27-7).

También se pueden utilizar fármacos que inhiben ya sea la calcineurina fosfatasa dependiente de calcio (ciclosporina y FK506) o inhiben la p70S6 quinasa que es importante para la señalización inducida por el factor de crecimiento (rapamicina). (Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993). En un aspecto adicional, las composiciones celulares de la presente invención pueden administrarse a un paciente junto con (p.ej., antes, simultáneamente o después) el trasplante de médula ósea, terapia ablativa de células T utilizando agentes de quimioterapia tales como fludarabina, terapia de radiación de haz externo (XRT), ciclofosfamida y/o anticuerpos tales como OKT3 o CAMPATH. En un aspecto, las composiciones celulares de la presente invención se administran después de una terapia ablativa de células B tal como agentes que reaccionan con CD20, p. ej., Rituxan. Por ejemplo, en una realización, los sujetos pueden someterse a un tratamiento estándar con altas dosis de quimioterapia, seguida de trasplante de células madre de la sangre periférica. En determinadas realizaciones, después del trasplante, los sujetos reciben una infusión de las células inmunes expandidas de la presente invención. En una realización adicional, las células expandidas se administran antes o después de la cirugía.

En una realización, al sujeto se le puede administrar un agente que reduce o mejora un efecto secundario asociado con la administración de una célula que expresa CAR. Efectos secundarios asociados con la administración de una célula que expresa CAR incluyen, pero no se limitan a CRS y la linfohistiocitosis hemofagocítica (HLH), también denominada Síndrome de Activación de Macrófagos (MAS, por sus siglas en inglés). Los síntomas de CRS incluyen fiebre alta, náuseas, hipotensión transitoria, hipoxia y similares. Por consiguiente, los métodos descritos en esta memoria pueden comprender administrar una célula que expresa CAR descrita en esta memoria a un sujeto y administrar adicionalmente un agente para gestionar niveles elevados de un factor soluble resultante del tratamiento con una célula que expresa CAR. En una realización, el factor soluble elevado en el sujeto es uno o más de IFN-γ, TNFα, IL-2 e IL-6. Por lo tanto, un agente administrado para tratar este efecto secundario puede ser un agente que neutralice uno o más de estos factores solubles. Agentes de este tipo incluyen, pero no se limitan a un esteroide, un inhibidor de TNFα y un inhibidor de IL-6. Un ejemplo de un inhibidor de TNFα es entanercept. Un ejemplo de un inhibidor de IL-6 es Tocilizumab (toc).

En una realización, al sujeto se le puede administrar un agente que potencie la actividad de una célula que expresa CAR. Por ejemplo, en una realización, el agente puede ser un agente que inhibe una molécula inhibidora. Moléculas inhibidoras, p. ej., Muerte Programada 1 (PD1), pueden, en algunas realizaciones, disminuir la capacidad de una célula que expresa CAR de montar una respuesta efectora inmune. Ejemplos de moléculas inhibidoras incluyen PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 y TGFR beta. La inhibición de una molécula inhibidora, p. ej., por inhibición al nivel de ADN, ARN o proteína, puede optimizar el comportamiento de la célula que expresa CAR. En realizaciones, un ácido nucleico inhibidor, p. ej., un ácido nucleico inhibidor, p. ej., un ARNdc, por ejemplo, un ARNip o ARNsh, puede utilizarse para inhibir la expresión de una molécula inhibidora en la célula que expresa CAR. En una realización, el inhibidor es un ARNsh. En una realización, la molécula inhibidora es inhibida dentro de una célula que expresa CAR. En estas realizaciones, una molécula de ARNdc que inhibe la expresión de la molécula inhibidora está enlazada al ácido nucleico que codifica un componente, p. ej., todos los componentes del CAR. En una realización, el inhibidor de una señal inhibidora puede ser, p. ej., un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a una molécula inhibidora. Por ejemplo, el agente puede ser un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a PD1, PD-L1, PD-L2 o CTLA4 (p. ej., ipilimumab (al que también se alude como MDX-010 y MDX-101, y comercializado como Yervoy®; Bristol-Myers Squibb; Tremelimumab (anticuerpo monoclonal IgG2 disponible de Pfizer, anteriormente conocido como ticilimumab, CP-675,206).).

PD1 es un miembro inhibidor de la familia de receptores CD28 que también incluye CD28, CTLA-4, ICOS y BTLA. PD-1 se expresa en células B activadas, células T y células mieloides (Agata et al. 1996 Int. Immunol 8:765-75). Se ha demostrado que dos ligandos para PD1, PD-L1 y PD-L2 regulan a la baja la activación de células T tras unirse a PD1 (Freeman et al. 2000 J Exp Med 192:1027-34; Latchman et al. 2001 Nat Immunol 2:261-8; Carter et al. 2002 Eur J Immunol 32:634-43). PD-L1 es abundante en cánceres humanos (Dong et al. 2003 J Mol Med 81:281-7; Blank et al. 2005 Cancer Immunol. Immunother 54:307-314; Konishi et al. 2004 Clin Cancer Res 10:5094). La supresión inmune puede invertirse inhibiendo la interacción local de PD1 con PD-L1. Anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y otros inhibidores de PD1, PD-L1 y PD-L2 están disponibles en la técnica y se pueden utilizar en combinación con un CAR CD123 descrito en esta memoria. Por ejemplo, nivolumab (al que también se alude como BMS-936558 o MDX1106; Bristol-Myers Squibb) es un anticuerpo monoclonal IgG4 completamente humano que bloquea específicamente PD-1. Nivolumab (clon 5C4) y otros anticuerpos monoclonales humanos que se unen específicamente a PD-1 se describen en los documentos US 8.008.449 y WO2006/121168. Pidilizumab (CT-011; Cure Tech) es un anticuerpo monoclonal IgG1k humanizado que se une a PD-1. Pidilizumab y otros anticuerpos monoclonales anti-PD1 humanizados se describen en el documento WO2009/101611. Lambrolizumab (también conocido como MK03475; Merck) es un anticuerpo monoclonal IgG4 humanizado que se une a PD1. Lambrolizumab y otros anticuerpos anti-PD1 humanizados se describen en los documentos US 8.354.509 y

WO2009/114335. MDPL3280A (Genentech / Roche) es un anticuerpo monoclonal IgG1 optimizado para Fc humano que se une a PD-L1. MDPL3280A y otros anticuerpos monoclonales humanos contra PD-L1 se describen en la Patente de EE. UU. N°.: 7.943.743 y la Publicación de EE.UU. N°.: 20120039906. Otros agentes de unión anti-PD-L1 incluyen YW243.55.S70 (regiones variables de la cadena pesada y ligera se muestran en SEQ ID NOs 20 y 21 en el documento WO2010/077634) y MDX-1 105 (al que también se alude como BMS-936559, y, p. ej., agentes de unión anti-PD-L1 descritos en el documento WO2007/005874). AMP-224 (B7-DCIg; Amplimmune; p. ej., descrito en el documento WO2010/027827 y WO2011/066342), es un receptor soluble de fusión PD-L2 Fc que bloquea la interacción entre PD1 y B7-H1. Otros anticuerpos anti-PD1 incluyen AMP 514 (Amplimmune), entre otros, p. ej., anticuerpos anti-PD1 descritos en los documentos US 8.609.089, US 2010028330 y/o US 20120114649. El agente que potencia la actividad de una célula que expresa CAR puede ser, p. ej., una proteína de fusión que comprende un primer dominio y un segundo dominio, en donde el primer dominio es una molécula inhibidora, o fragmento de la misma, y el segundo dominio es un polipéptido que está asociado con una señal positiva, p. ej., el polipéptido que está asociado con una señal positiva es CD28, ICOS y sus fragmentos, p. ej., un dominio de señalización intracelular de CD28 y/o ICOS. En una realización, la proteína de fusión es expresada por la misma célula que expresó el CAR. En otra realización, la proteína de fusión es expresada por una célula, p. ej., una célula T que no expresa un CAR anti-EGFRvIII.

En una realización, el agente que potencia la actividad de una célula que expresa CAR, descrita en esta memoria, es miR-17-92.

20 Composiciones farmacéuticas y tratamientos

Se describen en esta memoria composiciones farmacéuticas que comprenden una célula que expresa CAR, p. ej., una pluralidad de células que expresan CAR, tal como se describe en esta memoria, en combinación con uno o más soportes, diluyentes o excipientes farmacéutica o fisiológicamente aceptables. Dichas composiciones pueden comprender tampones, tales como solución salina tamponada neutra, solución salina tamponada con fosfato y similares; hidratos de carbono, tales como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos tales como glicina; antioxidantes; agentes quelantes, tales como EDTA o glutatión; adyuvantes (p. ej., hidróxido de aluminio); y conservantes. Las composiciones de la presente invención están formuladas en un aspecto para administración intravenosa.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse de una manera apropiada para la enfermedad a tratar (o prevenir). La cantidad y la frecuencia de la administración estarán determinadas por factores tales como la condición del paciente y el tipo y la gravedad de la enfermedad del paciente, aunque los ensayos clínicos pueden determinar las dosis apropiadas.

En un aspecto, la composición farmacéutica está sustancialmente libre de, p. ej., no hay niveles detectables de un contaminante, p. ej., seleccionado del grupo que consiste en endotoxina, micoplasma, lentivirus competente para la replicación (RCL), p24, VSV-G ácido nucleico, VIH gag, perlas residuales recubiertas anti-CD3/anti-CD28, anticuerpos de ratón, suero humano agrupado, albúmina de suero bovino, suero bovino, componentes de medios de cultivo, células de empaquetamiento de vectores o componentes plasmídicos, una bacteria y un hongo. En una realización, la bacteria es al menos una seleccionada del grupo que consiste en *Alcaligenes faecalis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenza*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia* y *Streptococcus pyogenes* grupo A.

Cuando se indica "una cantidad inmunológicamente eficaz", "una cantidad eficaz antitumoral", "una cantidad eficaz inhibidora de tumor" o "cantidad terapéutica", la cantidad precisa de las composiciones de la presente invención a administrar puede ser determinada por un médico teniendo en cuenta las diferencias individuales en edad, peso, tamaño del tumor, extensión de la infección o metástasis y el estado del paciente (sujeto). Generalmente se puede afirmar que una composición farmacéutica que comprende las células T descritas en esta memoria puede administrarse a una dosis de 10^4 a 10^9 células/kg de peso corporal, en algunos casos 10^5 a 10^6 células/kg de peso corporal, incluyendo todos los valores enteros dentro de esos intervalos. Las composiciones de células T también se pueden administrar múltiples veces a estas dosis. Las células pueden administrarse utilizando técnicas de infusión que se conocen comúnmente en inmunoterapia (véase, p. ej., Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988).

En determinados aspectos, puede desearse administrar células T activadas a un sujeto y luego volver a extraer sangre (o realizar una aféresis), activar células T a partir de ellas de acuerdo con la presente invención, y reinfundir al paciente estas células activadas y células T expandidas. Este proceso puede llevarse a cabo varias veces cada pocas semanas. En determinados aspectos, las células T pueden activarse a partir de extracciones de sangre de 10 cc a 400 cc. En determinados aspectos, las células T se activan a partir de extracciones de sangre de 20 cc, 30 cc, 40 cc, 50 cc, 60 cc, 70 cc, 80 cc, 90 cc o 100 cc.

La administración de las composiciones objeto puede llevarse a cabo de cualquier manera conveniente, incluyendo inhalación por aerosol, inyección, ingestión, transfusión, implantación o trasplante. Las composiciones descritas en esta memoria pueden administrarse a un paciente por vía transarterial, subcutánea, intradérmica, intratumoral, intranasal, intramedular, intramuscular, mediante inyección intravenosa (i.v.) o por vía intraperitoneal. En un aspecto, las

composiciones de células T de la presente invención se administran a un paciente mediante inyección intradérmica o subcutánea. En un aspecto, las composiciones de células T de la presente invención se administran por inyección i.v. Las composiciones de células T pueden inyectarse directamente en un tumor, ganglio linfático o sitio de infección.

5 En un aspecto a modo de ejemplo particular, los sujetos pueden sufrir leucoféresis, en donde los leucocitos se recogen, enriquecen o agotan ex vivo para seleccionar y/o aislar las células de interés, p. ej., células T. Estos aislados de células T pueden expandirse mediante métodos conocidos en la técnica y tratarse de tal manera que se puedan introducir una o más construcciones CAR de la invención, creando así una célula T CAR de la invención. Sujetos que lo necesiten pueden someterse a un tratamiento estándar con altas dosis de quimioterapia, seguida de trasplante de células madre de la sangre periférica. En determinados aspectos, después o de forma concomitante con el trasplante, los sujetos reciben una infusión de las células T CAR expandidas de la presente invención. En un aspecto adicional, las células expandidas se administran antes o después de la cirugía.

15 La dosificación de los tratamientos anteriores a administrar a un paciente variará con la naturaleza precisa de la afección que se esté tratando y el receptor del tratamiento. La escala de las dosis para la administración humana se puede realizar de acuerdo con las prácticas aceptadas en la técnica.

Ejemplos

20 Los siguientes ejemplos se proporcionan para fines de ilustración solamente.

Ejemplo 1: Células T autólogas redirigidas diseñadas para expresar el receptor de antígeno quimérico que fija como objetivo EGFRvIII en pacientes diagnosticados con glioblastoma EGFRvIII+

25 Los siguientes experimentos se diseñaron para abordar si las células T humanas redirigidas a la proteína de superficie EGFRvIII con un receptor de antígeno quimérico (CAR) basado en anticuerpos serían eficaces para eliminar un modelo EGFRvIII+ de glioblastoma multiforme en ratones NSG. Además, se diseñaron experimentos para evaluar el injerto y la persistencia de estas células. Se testan tres formas diferentes de CARs, que abarcan dos fragmentos variables de cadena sencilla diferentes (la porción del CAR que se une al antígeno EGFRvIII) y los dominios de señalización intracelular (4-1BB y CD3 zeta con y sin CD28).

30 El ratón NOD/scid/γcnull (NSG) inmunodeficiente es un excelente modelo de alotrasplante para injertar líneas de células tumorales humanas (la línea de tumor cerebral U87, que son EGFR+ y tiene versiones diseñadas para ser EGFRvIII+) y células T humanas. Después del injerto, las células T humanas pueden mantenerse en ratones NSG durante aproximadamente 2 meses, o hasta que se desarrolle la GVHD xenogénica fatal (xGVHD), que depende de la dosis y el donante de las células T humanas infundidas.

35 Brevemente, se creó un nuevo CAR (CAR 3C10) utilizando la plataforma lentiviral que incorpora un scFv derivado del anticuerpo monoclonal anti-EGFRvIII 3C10. Este CAR ha sido testado in vitro y en modelos de ratones xenogénicos. Modelos de ratón NOD/scid/γcnull (NSG) se han utilizado ampliamente para las evaluaciones pre-clínicas de la terapia CAR, incluida la evaluación de la persistencia a largo plazo de las células T humanas infundidas. Ratones NSG portadores de tumores U87-EGFRvIII el Día 7 en el cerebro recibieron inyecciones i.p. de temozolomida (1 mg/dosis) diariamente en los Días 7-11 e infusiones i.v. de: 2 x 10⁶ células T humanas ex vivo transducidas con CAR 3C10 o simulacro de mejora de la proteína de fluorescencia verde (EGFP)-vector los Días 7 y 17. El Día 21, las señales BLI eran indetectables en todos los ratones que recibieron células T transducidas con CAR, mientras que los ratones tratados con las células T transducidas de forma simulada, muestran el nuevo crecimiento del tumor en 4 de 5 ratones después del efecto antitumoral transitorio por temozolomida. En un experimento separado, los ratones tratados con células T CAR se sacrificaron el Día 21, y la infiltración de células T transducidas con CAR se evaluó por inmunohistoquímica utilizando mAb anti-F(ab')₂ conjugado con biotina (específico para el CAR 3C10) y estreptavidina-ficoeritrina (PE). Las células CAR-T infundidas por vía intravenosa parecieron infiltrarse fuertemente en el tumor basándose en las intensas señales de PE, mientras que el tejido de control teñido con estreptavidina-PE pero sin el mAb anti-F(ab')₂ mostró solo señales de fondo.

Los materiales y métodos empleados en estos experimentos son ahora.

55 Materiales y Métodos

Modelo de Ratón NSG

60 Se estableció recientemente una colonia de ratones NOD/scid/γcnull (NSG) inmunodeficientes. Los ratones NSG carecen de células T y B, células asesinas naturales, y también tienen una función deteriorada de las células dendríticas. Se ha confirmado que el injerto de células T activadas fue superior en ratones NSG frente al modelo de ratón NOD/scid/β2Mnull previo. Por lo tanto, el modelo NSG se utilizó para los experimentos de xenotrasplante humano.

Estructura y Características del Sistema Biológico

65

Aunque muchos de los Abs (anticuerpos) monoclonales y policlonales dirigidos contra EGFRvIII tienen reactividad cruzada con EGFR de tipo salvaje u otras proteínas no específicas, un anticuerpo monoclonal (mAb) 3C10, que fue desarrollado originalmente por inmunización de ratones con un péptido de 14 aminoácidos incluyendo la unión de fusión específica para EGFRvIII, demostró un reconocimiento altamente específico de EGFRvIII con unión detectable insignificante al EGFR de tipo salvaje (Okamoto et al., 1996 Br J Cancer 73:1366-1372). Se utilizó un vector lentiviral de calidad de investigación para la transducción de las células T.

Preparación de Células para la Infusión en Ratón

Las células para infusión en ratones son células T humanas. Los productos de aféresis enriquecidos con células mononucleares humanas se obtienen por leucaféresis de donantes voluntarios sanos por el University of Pennsylvania Human Immunology Core. Todas las muestras se recogen bajo un protocolo aprobado por la Junta de Revisión Institucional de la Universidad, y se obtiene el consentimiento informado por escrito de cada uno de los donantes. Las células T se seleccionan negativamente utilizando un cóctel de enriquecimiento de células T humanas RosetteSep (Stemcell Technologies, Vancouver, Canadá). Las células T se transfieren al laboratorio TRP en donde son activadas con perlas de CD3/28 de calidad de investigación y se expanden en RPMI con glutamina, FBS al 10%, Hepes 20 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 ug/ml. La transducción de vectores se produce 24 horas después con lentivectores empaquetados añadidos directamente a los cultivos activados. Las células se desproveen de perlas el día 5 y la expansión se controla con un aparato Coulter Multisizer 3 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) para detectar cambios en el tamaño (fl) y el recuento total de células, manteniendo la concentración entre 0,7E6 y 2E6 células/ml. La eficacia de la transducción para células T transducidas con CAR se testa mediante citometría de flujo mediante tinción con anticuerpo anti-ratón de cabra (GAM, para CARs basados en 3C10) o anti-humano de cabra (GAH, para CARs basados en 139). Los ratones son infundidos con 1 millón de células T CAR+ por ratón mediante inyección en la vena de la cola el día 0 del estudio.

Tratamiento con Temozolomida (TMZ)

Ratones portadores i.c. del tumor U87-EGFRvIII y que reciben células T CAR+ en el día 0 reciben posteriormente inyecciones intraperitoneales (i.p.) de TMZ los días 0-4 (diariamente durante 5 días):

TMZ se redisuelve en DMEM a razón de 6,67 mg/ml. Cada uno de los ratones recibe 50 µL de solución TMZ (333 microgramos/dosis; aproximadamente 17 mg/kg/dosis) mediante inyecciones i.p.

T CAR de calidad clínica

Las células T CART-EGFRvIII se preparan en la instalación clínica de producción de células y vacunas (CVPF), y el producto celular es linfocitos T autólogos. Las células T CD3+ se enriquecen a partir de un producto de leucoféresis por agotamiento de monocitos mediante elutriación centrífuga de contraflujo.

El día 0, el proceso de fabricación se inicia con la activación de las células T enriquecidas utilizando perlas magnéticas recubiertas con mAb anti-CD3/CD28. El cultivo de células T se expone al vector de lentivirus CAR EGFRvIII y se expande. El proceso de fabricación de células T se inicia en un cultivo de tejido estático (día 0 al día 5), seguido de la transferencia a un biorreactor Wave si es necesario para una expansión adicional en condiciones de perfusión. Al final del cultivo, las células se agotan de perlas magnéticas, se lavan, se concentran y se crioconservan. El producto de células T modificado se crioconserva en criobolsas en un volumen que depende del número de células (a una concentración final de como máximo 10⁸/ml) utilizando un congelador de velocidad controlada. Los productos de células CAR T EGFRvIII crioconservados se almacenan en un congelador monitorizado a ≤-130°C. Ahora se describen los resultados de los experimentos.

Erradicación de glioblastoma intracraneal que expresa EGFRvIII por parte de células T CAR

El glioblastoma (GBM) es el tumor cerebral primario más común y más maligno, y es el responsable de aproximadamente 12.000 muertes relacionadas con el cáncer en los Estados Unidos cada año. Los pacientes con GBM tienen una supervivencia media menor que 15 meses después del tratamiento con una combinación de quimioterapia (temozolomida) con radioterapia (RT). La terapia de transferencia celular adoptiva (ACT) con células T autólogas, especialmente con células T transducidas con receptores de antígeno quimérico (CARs), se ha mostrado prometedora en recientes ensayos de cáncer hematológico. ACT con células CART puede ser particularmente adecuada para pacientes con GBM, porque la especificidad, el número y el fenotipo funcional de células preparadas ex vivo pueden ser manipulados y controlados mejor que las células T nativas inducidas por la inmunización in vivo.

La variante III del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFRvIII) es la variante más común del EGFR observada en tumores humanos, pero rara vez se observa en tejido normal. Esta proteína resulta de la delección en el marco de los exones 2-7 y la generación de un nuevo residuo de glicina en la unión de los exones 1 y 8 dentro del dominio extracelular del EGFR, creando con ello un epítipo específico para el tumor. EGFRvIII se expresa en un 24% a 67% de GBM, pero no en tejidos normales.

Para desarrollar una terapia CAR eficaz para GBM, se generaron tres nuevas construcciones CAR lentivirales que fijan como objetivo EGFRvIII. Cada uno de estos vectores codifica un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) derivado de anticuerpos monoclonales (mAbs) murinos específicos para EGFRvIII para 3C10 o anticuerpos monoclonales (mAbs) humanizados específicos para EGFRvIII designados "139" (Figura 6). El scFv 3C10 se acopló con la bisagra CD8a, los dominios 4-1BB y CD3ζ con o sin dominios transmembrana e intracelular CD28 (3C10BBz28-CAR y 3C10BBz-CAR, respectivamente). El scFv 139 se acopló con los dominios bisagra CD8a, 4-1BB y CD3ζ (139BBz-CAR). Las células T humanas transducidas con cada uno de estos CARs demostraron una lisis específica y potente de células GBM humanas U87 que expresan EGFRvIII (U87-EGFRvIII); véase la Figura 7. Ratones inmunodeprimidos NOD/scid/yc(-/-) (NSG) portadores de tumores el Día 7 U87-EGFRvIII en el cerebro recibieron infusiones intravenosas de 1×10^6 células T humanas transducidas ex vivo con: 1) 139BBz-CAR; 2) 3C10BBz-CAR; 3) 3C10BBz28-CAR; 4) control CD19BBz-CAR que fija como objetivo CD19 humana. Estos ratones también recibieron inyecciones intraperitoneales de temozolomida (330 mcg/dosis) diariamente los Días 7-11. El crecimiento del tumor se controló mediante imágenes de bioluminiscencia (BLI) ya que las células U87-EGFRvIII también expresan luciferasa. Todos los ratones tratados solo con solución salina murieron el Día 21 debido al rápido crecimiento tumoral, y el tratamiento con temozolomida sin ACT inhibió pero no erradicó los tumores U87-EGFRvIII. Los ratones que recibieron células CAR-T CD19BBz y temozolomida demostraron algunas respuestas alogénicas contra U87-EGFRvIII, pero los tumores continuaron creciendo en estos ratones. Por otro lado, en todos los ratones que recibieron células T transducidas con 139BBz-CAR, 3C10BBz-CAR o 3C10BBz28-CAR, las señales BLI disminuyeron a niveles inferiores al nivel basal hacia el Día 21, sugiriendo la erradicación total del tumor (Figura 8). Es importante destacar que los ratones que recibieron células 3C10BBz-CAR eliminaron el tumor más rápido que las células 3C10BBz28 o 139BBz CART, lo que sugiere que la combinación de 3C10 con BBz podría proporcionar una mejor respuesta en los pacientes. El crecimiento del tumor y las respuestas inmunes periféricas se monitorizaron para determinar si alguno de los tres vectores EGFRvIII-CAR es superior a los otros para efectos antitumorales a largo plazo.

Los resultados presentados en esta memoria apoyan fuertemente el desarrollo de un ensayo clínico de Fase I de ACT con células CAR-T que fijan como objetivo EGFRvIII en pacientes con GBM que simultáneamente reciben quimioterapia de cuidado estándar con temozolomida.

Diseño clínico

Se diseñó un estudio piloto abierto de un solo brazo para determinar la seguridad, la tolerabilidad y el potencial de injerto de células T CART-EGFRvIII en pacientes con GBM recién diagnosticados con EGFRvIII+. En general, todos los sujetos reciben dosis de células T CART-EGFRvIII autólogas. Los sujetos elegibles son leucaféresados para obtener grandes números de células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) para la fabricación de CART-EGFRvIII. Las células T se purifican de la PBMC, se transducen con el vector lentiviral 3C10-CAR humanizado, se expanden in vitro y se crioconservan en partes alícuotas de dosis apropiadas. Las células a infundir se descongelan al lado de la cama inmediatamente antes de la infusión el día 0.

Los sujetos se someten a análisis de sangre para evaluar la seguridad, el injerto y la persistencia de las células CART EGFRvIII a intervalos regulares hasta la semana 4 (día 28). Los subconjuntos de células T circulantes que contienen el vector 3C10-CAR se evalúan en varios momentos después de la infusión y se comparan con la muestra de referencia. Después del día 28, los sujetos son evaluados mensualmente hasta 6 meses con un historial médico, un examen físico, MRI del cerebro y análisis de sangre o según el estándar de atención.

Los análisis de sangre de investigación se realizan simultáneamente con estas visitas. Después de los seis meses, los pacientes son seguidos cada 2 meses durante dos años. Después del período de dos años, los sujetos ingresan en un estudio de renovación para seguimiento anual por teléfono y cuestionario durante trece años adicionales para evaluar el diagnóstico de problemas de salud a largo plazo, tal como el desarrollo de una nueva neoplasia, según lo requerido por Regulaciones de la FDA relativas a los estudios de transferencia de genes.

Sin desear estar limitados por teoría particular alguna, se cree que debido a la expresión altamente restringida de la proteína EGFRvIII, no se anticipa ningún tipo de activación de células T fuera del tumor. Preferiblemente, solo se administra una infusión de CART-EGFRvIII y, por lo tanto, tampoco se anticipan respuestas de tipo alérgico. Sin embargo, una toxicidad con la que se puede topar es la inflamación de la activación transeúnte de células T en el sitio del tumor. Los síntomas y signos de edema cerebral se controlarán y gestionarán de cerca. En algunas realizaciones, la inflamación transeúnte de la activación de células T puede tratarse mediante la administración de un agente antiinflamatorio, tal como un agente esteroide.

Ejemplo 2: La co-transducción de miR-17-92 potencia la actividad antitumoral de células T transducidas con el receptor de antígeno quimérico anti-EGFRvIII en ratones que portan xenoinjertos de glioblastoma humano

La expresión de miR-17-92 confiere el fenotipo tipo 1 y la supervivencia potenciada de las células T. Se ha informado que miR-17-92 está regulado a la baja en células T derivadas de pacientes con glioblastoma (GBM). Para mejorar la eficacia de la terapia de transferencia adoptiva contra GBM utilizando células T transducidas con Receptores de Antígeno Quimérico (células T CAR), un nuevo vector lentiviral para miR-17-92 y se construyó un CAR que consiste en un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) específico para la variante III del receptor del factor de crecimiento epidérmico

(EGFRvIII) acoplado al módulo de señalización de la cadena CD3 ζ del receptor de células T y motivos co-estimulantes de CD137 (4-1BB) y CD28 en tándem (pELNS-3C10-CAR). Además de las actividades citotóxicas potentes y específicas para el antígeno contra células U87 GBM que expresan EGFRvIII de forma estable (U87-EGFRvIII), las células CAR-T co-transducidas con miR-17-92 exhibieron una resistencia mejorada a los efectos supresores de las células T del factor de crecimiento transformante (TGF)- β y temozolomida en comparación con las células CAR-T sin co-transducción miR-17-92. En ratones que portaban xenoinjertos intracraneales U87-EGFRvIII, las células CAR-T con o sin expresión de miR-17-92 derivada de transgén demostraron niveles similares de potentes efectos terapéuticos sin demostrar crecimiento incontrolado alguno de células CAR-T. Sin embargo, cuando estos ratones se volvieron a enfrentar a células U87-EGFRvIII en el cerebro, los ratones que recibieron células CAR-T co-transducidas mostraron una protección mejorada en comparación con los ratones tratados con células CAR-T sin co-transducción de miR-17-92. Estos datos apoyan que miR-17-92 se puede integrar en el CAR para mejorar la eficacia en pacientes con GBM.

Los resultados de los experimentos se describen ahora.

Construcción de vectores lentivirales para CAR específico para EGFRvIII y miR-17-92

Se generó un vector lentiviral para un CAR que reconoce la EGFRvIII a través de un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) derivado del anticuerpo monoclonal (mAb) 3C10 (pELNS-3C10-CAR específico para EGFRvIII humana (Véase la Figura 1A). En esta construcción, el promotor EF-1 α impulsa la proteína de fusión de CAR que integra el scFv derivado de 3C10, el dominio transmembrana (TM) CD28, así como los dominios 4-1BB e intracelular (ICD) y CD3 ζ . También se creó una construcción miR-17-92 lentiviral utilizando el vector auto-inactivante (SIN) basada en FG12 (FG12-EF1a-miR-17/92 (Véase la Figura 1B). En este vector, el promotor EF-1 α impulsa miR-17-92 y el promotor UbiC humano impulsa el gen marcador de la proteína verde fluorescente potenciada (EGFP) para rastrear células transducidas. Abreviaturas utilizadas en el esquema: RSV/HIV-1 5'LTR; repetición terminal larga R/U5 del promotor de RSV híbrido; EF-1 α ; promotor de la subunidad 1 α del factor de alargamiento humano, VH; región variable en la cadena pesada de la inmunoglobulina 3C10, VL; Región variable en la cadena ligera de la inmunoglobulina 3C10, HIV-1 Δ -3'LTR; auto-inactivación de repetición terminal larga de 3' con delección en la región U3, CMV/HIV-1 5' LTR repetición terminal larga R/U5 del promotor de CMV híbrido; UbiC; promotor de ubiquitina C.

Caracterización in vitro de células T humanas transducidas con el CAR y miR-17-92

Células T CD3⁺ derivadas de donantes sanos se transdujeron con pELNS-3C10-CAR, y las células se evaluaron para determinar los niveles de expresión del transgen por citometría de flujo para la expresión de CAR 3C10 y miR-17-92 mediante anticuerpo (Fab')₂ anti- ratón y EGFP, respectivamente (Figura 2A, izquierda). Utilizando el Ab (Fab')₂ anti- ratón que es específico para el scFv derivado de 3C10 en células T humanas, se detectaron en su superficie casi la mitad (48,9%) de las células T que expresan el scFv derivado de 3C10.

Para obtener células T humanas que expresan tanto el CAR como el miR-17-92 derivado del transgén, células T CD3⁺ se transdujeron conjuntamente con pELNS-3C10-CAR y FG12-EF1a-miR-17/92 mediante infección secuencial de los dos vectores lentivirales. A las 24 horas después de la transducción inicial con pELNS-3C10-CAR, las células T se transdujeron con FG12-EF1a-miR-17-92. Se observó que aproximadamente una cuarta parte (23,6%) del total de células T expresó tanto CAR como EGFP (Figura 2A, derecha). Para estudios in vitro posteriores, las células T transducidas con CAR (células CAR-T) se enriquecieron utilizando Ab F(ab')₂ anti-ratón biotinilado y MACS anti-biotina. Basado en la eficiencia de la co-transducción (Figura 2A, derecha), al menos el 50% de las células CAR-T también expresaron EGFR (de ahí el miR-17-92 derivado del transgén). Mediante PCR en tiempo real, se detectó una expresión 3-4 veces mayor de miR-17-92 en las células CAR-T enriquecidas con Ab F(ab')₂, co-transducidas con miR-17-92 en comparación con células T transducidas con el CAR solo (Figura 2B). La Figura 2B demuestra los niveles de expresión de los miembros del grupo miR-17-92, miR-17-3p, miR-17-5p y miR-92a-1 en células T transducidas medida por qRT-PCR. Se representan los valores medios \pm DE de 3 mediciones de réplica de uno de los tres experimentos con resultados similares. * indica p < 0,05 entre los dos grupos utilizando el test t de Student. La Figura 2C representa actividades citotóxicas específicas para EGFRvIII de células T transducidas evaluadas por un ensayo de liberación de ⁵¹Cr de 12 h en diversas relaciones E:T contra células U87-EGFRvIII marcadas con ⁵¹Cr o células U87 de control. Las células de control fueron células T transducidas simuladas (EGFP). Los valores indican la media \pm DE en pocillos triplicados.

Mientras que las células T transducidas simuladas mostraron solo niveles de lisis de fondo contra células U87 (EGFRvIII-negativas) y U87-EGFRvIII parentales, las células T transducidas con el CAR demostraron una lisis potente y específica de humanos de células GBM U87 que expresan EGFRvIII (U87-EGFRvIII) con solo niveles de fondo de efectos citotóxicos contra las células U87 parentales (Figura 2C). En estos ensayos de 12 h de liberación de ⁵¹Cr, la co-transducción de células CAR-T con miR-17-92 no potenció significativamente su actividad citotóxica específica contra las células diana U87-EGFRvIII.

La co-transducción de miR-17-92 confiere una liberación de IFN- γ y resistencia mejoradas a efectos supresores por parte de TGF- β y temozolomida (TMZ - terapia de atención estándar)

En un estudio previo (Sasaki et al., 2010, J. Transl Med 8:17), células T CD4⁺ derivadas de ratones transgénicos miR-17-92 demostraron una mayor producción de IFN- γ en comparación con sus contrapartidas derivadas de ratones de tipo salvaje; y la transfección de células T Jurkat humanas con miR-17-92 conducen a una resistencia potenciada a la muerte celular inducida por activación (AICD).

Se realizaron experimentos para evaluar si la co-transducción de células CAR-T con miR-17-92 confiere una producción mejorada de IFN- γ , proliferación celular y menores grados de muerte apoptótica cuando se exponen a un agente de quimioterapia TMZ o un citoquina inmunosupresora TGF- β .

Cuando las células CAR-T se estimularon con células presentadoras de antígeno artificiales transducidas por EGFRvIII (aAPC) sin TGF- β o TMZ, las células expresaron niveles similares de IFN- γ con o sin co-transducción. Sin embargo, cuando las células se expusieron a dosis crecientes de TGF- β o TMZ, las células CAR-T sin co-transducción con miR-17-92 produjeron niveles significativamente reducidos de IFN- γ , mientras que las células CAR-T co-transducidas mantuvieron un alto nivel de producción de IFN- γ (Figura 3A). Las barras abiertas y las barras cerradas representan los resultados de las células CAR-T (sin miR-17-92) y las células CAR-T co-transducidas con miR-17-92, respectivamente. La Figura 3A muestra IFN- γ producido por las células T transducidas durante las últimas 24 h de 96 h de co-cultivo. La Figura 3B muestra que los niveles de proliferación relativa entre los grupos se evaluaron mediante el ensayo WST1 después del curso de co-cultivo de 3 días. Las Figuras 3C y 3D muestran la muerte apoptótica de células CAR-T evaluadas por Anexina-V y PI. La Figura 3C muestra la intensidad fluorescente media para Anexina-V en células CAR-T expuestas a TMZ. Los valores indican la media \pm DE en pocillos triplicados. (* indica $P < 0,05$) La figura 3D muestra histogramas citométricos de flujo para Anexina-V⁺ y/o PI⁺ en uno de los tres experimentos con resultados similares.

Se realizaron experimentos para evaluar los efectos de la co-transducción de miR-17-92 sobre la proliferación de células CAR-T en presencia de TMZ en cultivo. Los experimentos se diseñaron para inducir la proliferación de células CAR-T con aAPC que expresa EGFRvIII y la proliferación se evaluó mediante el ensayo WST-1 (Figura 3B). Sin TMZ, las células CAR-T co-transducidas con miR-17-92 demostraron una tendencia hacia una tasa de proliferación más rápida en comparación con las células CAR-T de control, pero la diferencia no fue significativa. Para evaluar específicamente el impacto de TMZ sobre la proliferación de células CAR-T, en la Figura 3B se representa la tasa de proliferación de las células en cada uno de los grupos en relación con la proliferación de las mismas células sin TMZ. Cuando se añaden concentraciones crecientes de TMZ en el cultivo, el grado de supresión del crecimiento era significativamente menor en las células CAR-T co-transducidas con miR-17-92 en comparación con células CAR-T control.

Se realizaron experimentos para evaluar si la co-transducción de miR-17-92 haría que las células CAR-T fueran más resistentes a la apoptosis inducida por TMZ. Para este fin, se realizaron evaluaciones de citometría de flujo de Anexina V⁺ y yoduro de propidio (PI)⁺ en células CAR-T en concentraciones crecientes de TMZ (Figuras 3C y 3D). Se observó un aumento dependiente de la dosis tanto de células apoptóticas tempranas (Anexina V⁺PI⁻), apoptóticas/necróticas (Anexina V⁺PI⁺) como necróticas (Anexina V⁻PI⁺) y células CAR-T co-transducidas con miR-17-92 demostraron grados menores de los cambios apoptóticos en comparación con células CAR-T de control.

La inyección intravenosa de células CAR-T en combinación con TMZ conduce a una remisión completa de tumores U87-EGFRvIII establecidos en ratones NSG

Se realizaron experimentos para evaluar la eficacia de células CAR-T en ratones NOD/scid/yc(-/-) (NSG) inmunocomprometidos portadores de tumores intracraneales U87-EGFRvIII establecidos (Día 7). Los ratones recibieron una sola infusión intravenosa (i.v.) de células CAR-T co-transducidas con miR-17-92, células CAR-T sin co-transducción con miR-17-92, o células T transducidas de modo simulado (2×10^6 /ratón) a través de la vena de la cola. A medida que los pacientes con GBM recién diagnosticados reciben terapia TMZ de manera rutinaria, los experimentos se diseñaron para administrar inyecciones diarias por vía intraperitoneal (i.p.) de TMZ durante 5 días a partir del día de la infusión de células T (Figura 4A). La Figura 4B muestra un análisis de Kaplan-Meier. La mediana de supervivencia de los ratones tratados con células CAR-T (con o sin co-transducción de miR-17-92) fue significativamente mayor en comparación con ratones con células T transducidas de modo simulado ($p < 0,05$). El tratamiento con TMZ en sí mismo fue ineficaz, ya que todos los ratones de control que recibieron TMZ y células T transducidas de modo simulado murieron dentro de las 3 semanas (día 21) después de la infusión de células T (Figura 4B). Aunque uno de los cinco ratones con células CAR-T y dos de los cinco ratones con células CAR-T co-transducidas con miR-17-92 murieron por la progresión del tumor el día 22, todos los otros ratones en estos grupos sobrevivieron más de 40 días. Los resultados son de uno de dos experimentos independientes con resultados similares. No hubo una diferencia estadísticamente significativa en la supervivencia de los ratones que recibieron células CAR-T co-transducidas con miR-17-92 frente a células CAR-T sin co-transducción con miR-17-92 (prueba de log-rank: $p = 0,5485$).

Células CAR-T co-transducidas con miR-17-92 confieren una protección persistente contra tumores U87-EGFRvIII en ratones

Para determinar si las células CAR-T infundidas en los ratones en el experimento presentado en la Figura 4 pueden proporcionar protección a largo plazo de los huéspedes contra los tumores U87-EGFRvIII, los supervivientes se volvieron a enfrentar a la inoculación de células U87-EGFRvIII en el hemisferio contra-lateral del cerebro el día 49 (Figura 5). Si

bien las células tumorales re-estimuladas crecieron en los tres ratones tratados con células CAR-T, ninguno de los ratones tratados con células CAR-T co-transducidas con miR-17-92 demostró señales BLI más allá de los niveles de fondo. Estos resultados sugieren fuertemente que la co-transducción del grupo miR-17-92 confiere persistencia a largo plazo de las células CAR-T, proporcionando así una protección prolongada del huésped contra el crecimiento del tumor. Mediciones longitudinales del flujo medio de fotones derivado del tumor \pm DE de los 2 grupos de ratones. El nivel de luminiscencia de fondo (hasta 10^3 p/s) se definió en base a los niveles observados en ratones no portadores de tumores representados en imágenes en paralelo con ratones portadores de tumores en grupos de tratamiento.

miR-17-92 se puede integrar en el CAR para mejorar la eficacia

Los resultados presentados en esta memoria demuestran los efectos de la co-expresión de miR-17-92 en células T transducidas con el nuevo CAR anti-EGFRvIII (CAR 3C10) integrando el scFv 3C10 con cadena CD3 ζ , CD137 (4-1BB) y CD28. Los resultados actuales demuestran que la co-expresión de miR-17-92 confiere una resistencia mejorada a los efectos supresores del crecimiento de células T de TGF- β y temozolomida. In vivo, las células T co-transdujeron con CAR 3C10 y miR-17-92 demostraron efectos terapéuticos más persistentes en comparación con células T transducidas con CAR 3C10 solo.

La transducción lentiviral de miR-17-92 en el presente estudio confiere una sobre-expresión ectópica del grupo miR en las células T transducidas. En condiciones fisiológicas, sin embargo, los niveles de expresión de miR-17-92 endógeno en las células T parecen estar estrechamente regulados. En células T CD8 $^+$ humanas, la expresión de miR-17-92 se detecta en niveles elevados en células naïf pero disminuye a medida que las células se diferencian (Salaun et al., 2011, J Transl Med 9:44). En un modelo de ratón de infección por el virus de la coriomeningitis linfocítica, miR-17-92 está fuertemente regulado al alza después de la activación de las células T, pero está regulado a la baja después de la expansión clonal, y está silenciado además durante el desarrollo de la memoria (Wu et al., 2012, Proc Natl Acad Sci USA 109:9965-9970). En este estudio de referencia, miR-17-92 es necesario para la rápida expansión de las células T y su expresión de IFN- γ .

Sin embargo, la sobreexpresión de miR-17-92 sesga la diferenciación hacia las células efectoras terminales de vida corta. La falta de regulación a la baja de miR-17-92 conduce a una pérdida gradual de las células de memoria y al desarrollo defectuoso de las células de la memoria central (Wu et al., 2012, Proc Natl Acad Sci USA 109:9965-9970). Estas observaciones no son necesariamente consistentes con los resultados presentados en esta memoria, ya que se observó la persistencia de las células CAR-T co-transducidas con miR-17-92 y su capacidad eficiente para proteger a los huéspedes de una re-estimulación de células U87-EGFRvIII. Sin desear estar ligado por teoría particular alguna, se cree que esta observación es atribuible a los efectos combinatorios de las moléculas co-estimulantes proporcionadas en el CAR y el miR-17-92.

Aunque miR-17-92 ha sido descrito como un miR oncogénico (van Haaften y Agami, 2010, Genes & Development 24:1-4), se sabe que la sobre-expresión de miR-17-92 en sí misma no es oncogénica en los linfocitos (Xiao et al., 2008, Nat Immunol 9: 405-414). De hecho, en el presente estudio no se observó proliferación incontrolada de células T transducidas con miR-17-92.

No obstante, como un enfoque alternativo para una mejor garantía de seguridad, la transducción transitoria de células T con miR-17-92 en sí, en lugar de la transferencia lentiviral estable, y la inyección múltiple de esas células T puede representar un enfoque razonable sin las preocupaciones de seguridad asociadas de integrar vectores virales (Zhao et al., 2010, Cancer Research 70:9053-9061).

En lo que respecta a los CARs que fijan como objetivo EGFRvIII para la terapia de GBM, recientemente, Morgan et al. evaluaron secuencias de scFv derivadas de siete mAbs anti-EGFRvIII diferentes, incluidos 3C10 y 139 humano, en CARs γ -retrovirales (Morgan et al., 2012, Hum Gene Ther 23: 1043-1053). La caracterización in vitro de esos CARs reveló el 3C10 y el 139 como dos de los tres clones que proporcionaron la producción específica de IFN- γ en respuesta a las células diana que expresan EGFRvIII, pero no a las células que expresan el gen EGFR de tipo salvaje.

También es importante reconocer que EGFRvIII se expresa solo en una población de pacientes con GBM y fracciones de las células GBM incluso en casos "EGFRvIII-positivos" (Heimberger et al., 2005, Clin. Cáncer Res. 11:1462 -1466). La inmunoterapia que fija como objetivo EGFRvIII como única diana probablemente dará como resultado el crecimiento de células GBM que han regulado a la baja antígeno que fija como objetivo la inmunoterapia (Sampson et al., 2010, J Clin Oncol 28:4722-4729). Un cierto número de estudios previos han desarrollado CARs contra antígenos asociados con GBM, tales como IL-13R α 2 (Kong et al., 2012, Clin Cancer Res 18: 5949-5960; Kahlon et al., 2004, Cancer Res. 64:9160- 9166), HER-2 (Ahmed et al., 2010, Clinical Cancer Research 16:474-485) y EphA2 (Chow, K.K. et al. T Cells Redirected to EphA2 for the Immunotherapy of Glioblastoma. Mol Ther (2012). Sin desear estar ligado a teoría particular alguna, se cree que la terapia CAR efectiva debería emplear en última instancia células T que sean capaces de resistir los mecanismos de supresión inducidos por GBM y fijar como objetivo múltiples antígenos, de modo que las células T infundidas exhiban efectos terapéuticos efectivos y sostenidos contra GBM con perfiles de expresión de antígeno heterogéneos.

Los resultados presentados en esta memoria demuestran los beneficios de utilizar células T co-transducidas con pELNS-3C10-CAR y FG12-EF1a-miR-17/92. Como un enfoque alternativo para lograr la co-expresión del transgén CAR y miR-

17-92, se construyó un vector lentiviral basado en pELNS que expresa tanto el gen 3C10-CAR como el gen miR-17-92 como una única transcripción. El uso de este único vector "en tándem" puede tener una ventaja en términos de procedimientos de transducción relativamente simples y procesos reguladores directos en comparación con el enfoque basado en dos vectores. Además, todas las células T que expresan el CAR también deberían expresar miR-17-92.

Sin embargo, se encontró que la eficiencia de transducción del vector "en tándem" es menor que la del enfoque de dos vectores, probablemente porque el título de lentivirus disminuye a medida que aumenta el tamaño de la inserción. Como se comentó en otra parte de esta memoria, la transducción lentiviral del gen 3C10-CAR y la electroporación de miR-17-92 en combinación pueden ser una estrategia factible.

En el presente estudio, también se encontró que del 40% al 60% de las células CAR-T CD3⁺ eran CD4⁺, y que las células CAR-T CD4⁺ lisaron eficazmente las células U87-EGFRvIII de una manera específica para EGFRvIII. Se ha informado que las células T Perforina⁺ CD4⁺ median en las actividades citotóxicas a través de la vía perforina/granzima B, pero no la vía Fas/FasL (Porakishvili et al., 2004, Haematologica 89:435-443). Por lo tanto, se cree que las células CAR-T CD4⁺ en el presente estudio expresaron perforina y granzima B para mediar en las actividades líticas observadas contra las células U87-EGFRvIII.

En resumen, el estudio actual proporciona una base sólida para la evaluación de la terapia CAR integrando miR-17-92.

Ejemplo 3: Secuencias de CAR

El anticuerpo monoclonal (mAb) murino 3C10 fue desarrollado originalmente por la inmunización de ratones con un péptido de 14 aminoácidos (PEP3) que incluye la unión de fusión específica para EGFRvIII y demostró un reconocimiento altamente específico de EGFRvIII sin ninguna unión detectable a EGFR de tipo salvaje (Okamoto et al, British J. Cancer 1996, 73: 1366-1372). Posteriormente, se produjo un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) del mAb 3C10 y se obtuvo ADNc para el scFv 3C10. Si bien la avidéz y/o la especificidad antigénica de los mAbs originales se pueden perder a menudo en formas scFv, el scFv 3C10 retuvo su reactividad selectiva con el epítipo específico para EGFRvIII (Nakayashiki et al., Jpn. J.Cancer Res. 2000, 91:1035-1043).

Se construyó un CAR EGFRvIII clonando el scFv 3C10 (ratón) con CD28, 4-1BB y CD3 zeta en el plásmido de cadena principal lentiviral pELNS (promotor EF1). Se generó otro CAR EGFRvIII clonando el scFv 3C10 en una cadena principal lentiviral bisagra CD8a/ CD8TM/4-1BB/CD3zeta pELNS, que se expresa por el promotor EF1a.

CAR scFv3C10-CD28BBzeta (Aminoácido) (SEQ ID NO: 1)

MALPVTALLLPLALLLHAARPGSEIQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIEDY
YIHWVKQRTEQGLEWIGRIDPENDETKYGPIFQGRATITADTSSNTVYLQLSSLTS

EDTAVYYCAFRGGVYWGPGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSHMDVVMVTQSPL
TLSVAIGQSASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLISLVSKLDSGVPDRFTG
SGSGTDFTLRISVEAEDLGIYYCWQGTHFPGTFGGGTKLEIKASTTTPAPR
PPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDFWVLVVVGGVLACYSL
LVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSKR
GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQ
GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA
YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

CAR scFv3C10-BBz (Aminoácido) (SEQ ID NO: 2)

MALPVTALLLPLALLLHAARPGSEIQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIE
 DYYIHWVKQRTEQGLEWIGRIDPENDETKYGPIFQGRATITADTSSNTVYLQLSSLTSE
 5 DTAVYYCAFRGGVYWGPGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSHMDVVMQTQSPL
 TLSVAIGQSASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLISLVSKLDSGVPD
 RFTGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGIYYCWQGTHFPGTFGGGKLEIKASTTTPAPR
 10 PPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSL
 VITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAP
 AYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK
 15 MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

CAR scFv3C10-CD28BBzeta (Ácido nucleico) (SEQ ID NO: 18)

atggccttaccagtaccgccttgcctcctgcctgctgctccacgccgccaggccgggatccgagattcagctgcag
 caatctggggcagaactgtgaagccaggggcctcagtcagctgctgcacaggttctgcttcaacattgaagactatat
 tcactgggtgaagcagaggactgaacagggcctggaatggattggaaggattgatcctgagaatgatgaaactaaatggccc
 25 aatattccagggcagggccactataacagcagacacatcctccaacacagtctacctgcaactcagcagcctgacatctgagga
 cactgccgtctattactgtgccttcgcgggtgagctactgggggccaggaaaccactctcacagtctcctcaggagggtggtggtccggt
 ggtggtggttccggagggtggtggttcacatggatggtgtgatgccagctcctcactcactctatcggttgcattggac
 30 aatcagcctccatctcttgcaagtcagagcctcttagatagtgatggaaagacatattgaattggtgttacagaggccaggccagt
 ctccaagcgcctaactctctgtgtctaaactggactctggagtcctgacagggtcactggcagtgatcagggac
 agatttcacactgagaatcagcagagtgagggtgaggattgggaattattattgctggcaagggtacacatttctcgggacgtt
 35 cggtggaggggaccaagctggagataaaagctagcaccacgacgccagcgccgcgaccaccaacaccggcgccaccatcg
 cgtcgcagccccgtccctgcgcccagaggcgtgccggccagcgccggggggcgagtgacacaggggggtgacttcgcctgt
 40 gattttgggtgctggtggtggtggtgagtcctggctgctatagctgctagtaacagtgcccttattattttctgggtg
 aggagtaagaggagcaggctcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgccggcccccggcccccgaagcattacc
 agccctatgccccaccacgcgacttcgcagcctatcgtccaaacggggcagaaagaaactcctgtatatttcaaacaccatt
 45 tatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgattccagaagaagaaggaggatgtgaactga
 gagtgaagttcagcaggagcgagacgccccgcgtacaagcaggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagag
 aggagtacgatgttttgacaagagacgtggccgggaccctgagatggggggaagccgagaaggaagaacctt
 50 caggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgcagattgggatgaaggcgagcgccgg
 aggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccc
 tgccccctcgc

CAR scFv3C10-BBz (Ácido nucleico) (SEQ ID NO: 19)

ES 2 760 023 T3

5 Atggccttaccagtgaaccgcttgctcctgccgtggccttgctgtccacgccagggccggatccgagattcagctgca
 gcaatctggggcagaacttgtaagccaggggctcagtcagctgtcctgcacaggttctggcttcaacattgaagactactat
 attcactgggtgaagcagaggactgaacagggcctggaatggattggaaggattgatcctgagaatgatgaaactaaatatggc
 ccaatattccagggcagggccactataacagcagacacatctccaacacagcttacctgcaactcagcagcctgacatctgaggacact
 gccgtctattactgtgcttttcgggtggagtctactgggggcccaggaaccactctcacagtctcctcaggaggtggtg
 10 gtccgggtggtggtggtccggaggtggtgtcacatatggatgttgatgacccagctctccactcactctatcggttgccattg
 gacaatcagcctcatctcttgaagtcagtcagcctcttagatagtgatgaaagacatattgaattggtgttacagaggc
 caggccagctcctcaagcgcctaattctctgtgtctaaactggactctggagtcctgacaggttactggcagtggtatcagg
 15 gacagatttcacactgagaatcagcagagtgagggtgaggttgggaattattattgtctggcaaggtacacatttctgggacgttcg
 gtggagggaccaagctggagataaaagctagcaccacgacgcagcggcgaccaccaacaccggcgcccacc
 atcgcgtcgcagccccgtccctgcgcccagagggcgtgcccggccagcggcgggggcgagtgcacacgagggggctgg
 20 acttcgcctgtgatatctacatctggcgcccttgccgggactgtggggctcttctcctgtcactgggtatcaccttactgcaa
 acggggcagaaaagaactcctgtatatattcaacaacatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagc
 tgccgatttcagaagaagaagaaggaggtgtaactgagagtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtacaagcaggg
 25 ccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttgacaagagacgtggccggg
 accctgagatgggggaaagccgagaaggaagaacctcagggaaggcctgtacaatgaactgcagaagataagatggcgaggcc
 tacagtgagattgggatgaaaggcgagcggcgaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaagga
 30 cacctacgacgccccttcacatgcaggccctgccccctcgc

El fragmento scFv denominado "139" es un anticuerpo humano contra EGFRvIII (Morgan et al., 2012 Hum Gene Ther 23(10): 1043-53). Se generó un CAR EGFRvIII que comprende el scFv 139 sintetizando inicialmente el scFv 139. La secuencia para el scFv 139 se clonó con una secuencia conductora, bisagra CD8, dominio transmembrana (TM) y los dominios de señalización deseados. Por ejemplo, la secuencia para el scFv 139 se clonó con los dominios de señalización para 4-1BB y CD3 zeta. La construcción CAR (scFv139-BBZ) se expresa a partir del vector pELNS para la producción de lentivirus.

CAR scFv139-BBz (Aminoácido) (SEQ ID NO: 3)

40 MALPVTALLLPLALLLHAARPGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNNL
 AWYQQKPGKAPKRLIYAASNLQSGVPSRFTGSGSGTEFTLIVSSLQPEDFATYYC
 45 LQHHSYPLTSGGGTKVEIKRTGSTSGSGKPGSGEGSEVQVLESGGGLVQPGGSLR
 LSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTNYADSVKGRFTISR
 NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGSSGWSEYWGQGLVTVSSASTTTPAPRP
 50 PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLV
 ITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPA
 YKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRKRRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM
 55 AEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

CAR scFv139-BBz (Ácido nucleico) (SEQ ID NO: 20)

60

65

Atggcctfaccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctccacgccgccaggccgggatccgacatccagatgacccaga
 gccctagcagcctgagcgccagcgtggcgacagagtaccatcacctgtcgggccagccaggccatcagaaaca
 5 acctggcctggtatcagcagaagccggcaaggcccccagaagactgatctacgctgccagcaatctgcagagcggcgtgcc
 cagcagattcaccggaagcggctcggcaccgagttcacctgatcgtgtccagcctgcagcccaggacttcgccactact
 actgctgcagcaccacagctaccctctgaccagcggcggaggcaccaggtggagatcaagcggaccggcagcaccagc
 10 ggcagcggcaagcctggcagcggcgagggaagcgaggtccaggtgctggaatctggcggcggactggtgcagcctggcggcagc
 ctgagactgagctgtgccgccagcggcttcaccttcagcagctacgccatgtcttgggtccggcaggctcctggaag
 ggcctggaatgggtgtccgccatcagcggctgtggcgctccaccaactacgccgacagcgtgaaggcggggttcaccatcagccgg
 15 gacaacagcaagaacacctgtatctgcagatgaacagcctgagagccgaggacaccgctgtactactgtgccgg
 cagcagcgggtggagcggagtactggggccagggcacactggtcacagtgtctagcgtagcaccacgacgccagcggcgc
 20 gaccaccaacaccggcgcccaccatcgctgcagccccgtccctgcgccagaggcgtgccggccagcggcgggggg
 cgagtgacacgagggggctggacttcgctgtgatctacatctggcgcccttggccgggactgtggtgctctctctgctactg
 gttatcacctttactgcaaacggggcagaagaaactcctgtatatattcaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagagga
 25 agatggctgtagctgcgatttcagaagaagaaggaggatgtgaactgagagtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgc
 gtacaagcaggggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttgacaagagacgtggccgg
 gaccctgagatggggggaaagccgagaaggagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggagg
 30 cctacagttagattgggatgaaagcgagcggcgagggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacgccaccaag
 gacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgccccctcgct

35 COMPONENTES DEL CAR

SECUENCIAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS:

40 • Secuencia de Nucleótidos scFv 3C10 (Ratón); (SEQ ID NO: 4)

GAGATTCAGCTGCAGCAATCTGGGGCAGAACTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAGTCA
 AGCTGTCCTGCACAGGTTCTGGCTTCAACATTGAAGACTACTATATTCAGTGGGTG
 45 AAGCAGAGGACTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGGAAGGATTGATCCTGAGAATG
 ATGAAACTAAATATGGCCCAATATTCCAGGGCAGGGCCACTATAACAGCAGACAC
 ATCCTCCAACACAGTCTACCTGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCG
 50 TCTATTACTGTGCCTTTCGCGGTGGAGTCTACTGGGGGCCAGGAACCACTCTCACA
 GTCTCCTCAGGAGGTGGTGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCGGAGGTGGTGGTTCACA
 TATGGATGTTGTGATGACCCAGTCTCCACTCACTCTATCGGTTGCCATTGGACAATC
 55 AGCCTCCATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACAT
 ATTTGAATTGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCAAAGCGCCTAATCTCTCTG
 GTGTCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGAC
 60 AGATTTACACTGAGAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAATTTATTATT
 GCTGGCAAGGTACACATTTTCCTGGGACGTTCCGGTGGAGGGACCAAGCTGGAGAT
 65 AAAA

- Secuencia de Nucleótidos scFv 139 (Humanizada); (SEQ ID NO: 5)

5 GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAG
TGACCATCACCTGTCGGGCCAGCCAGGGCATCAGAAACAACCTGGCCTGGTATCA
GCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCAAGAGACTGATCTACGCTGCCAGCAATCTGCAG
10 AGCGGCGTGCCAGCAGATTACCGGAAGCGGCTCCGGCACCGAGTTCACCTGA
TCGTGTCCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCTGCAGCACCAC
AGCTACCTCTGACCAGCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGGACCGGCA
15 GCACCAGCGGCAGCGGCAAGCCTGGCAGCGGCGAGGGAAGCGAGGTCCAGGTGCT
GGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGTGCC
GCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGCCATGTCTTGGGTCCGGCAGGCTCCTGG
20 AAAGGGCCTGGAATGGGTGTCCGCCATCAGCGGCTCTGGCGGCTCCACCAACTAC
GCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCC
TGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCC
25 GGCAGCAGCGGGTGGAGCGAGTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTTCACAGTGTCTA
GC

- conductor (secuencia de ácidos nucleicos); (SEQ ID NO: 6)

30 ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGC
CGCCAGGCCG

- bisagra (secuencia de ácidos nucleicos); (SEQ ID NO: 7)

35 ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGC
40 AGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGT
GCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGAT

- transmembrana (secuencia de ácidos nucleicos); (SEQ ID NO: 8)

45 ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACT
GGTTATCACCTTTACTGC

- dominio intracelular 4-1BB (secuencia de ácidos nucleicos); (SEQ ID NO: 9)

55 AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGAC
CAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGA
60 AGAAGGAGGATGTGAACTG

- CD3 zeta (secuencia de ácidos nucleicos); (SEQ ID NO: 10)

65

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACAAGCAGGGCCAG
AACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTT
TGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGA
AGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGG
AGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGC
ACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGC
CCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

CD3 zeta (secuencia de ácidos nucleicos; Secuencia de Referencia de NCBI NM_000734.3); (SEQ ID NO:100)

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAG
AACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTT
TGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGA
AGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGG
AGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGC
ACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGC
CCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS:

Secuencia de Amino scFv 3C10 (Ratón); (SEQ ID NO: 11)

EIQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIEDYYIHVWKQRTEQGLEWIGRIDPEN
DETKYGPFIQGRATITADTSSNTVYLQLSSLTSEDYAVYYCAFRGGVYWGPGTTL
TVSSGGGGSGGGSGGGGSHMDVVMQSPVTLTSAIGQSASISCKSSQSLDSDG
KTYLNWLLQRPQGSPKRLISLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGI
YYCWQGTHTFPGTFGGGTKLEIK

Secuencia de Amino scFv 139 (Humana); (SEQ ID NO: 12)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNNLAWYQQKPGKAPKRLIYAASNQ
SGVPSRFTGSGSGTEFTLIVSSLQPEDFATYYCLQHHSYPLTSGGGTKVEIKRTGS
TSGSGKPGSGEGSEVQVLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP
GKGLEWVSAISGSGGSTNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY
CAGSSGWSEYWGQGLTVTVSS

conductor (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 13)

MALPVTALLPLALLHAARP

bisagra (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 14)

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD

- transmembrana (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 15)

IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC

- dominio intracelular 4-1BB (secuencia de aminoácidos); (SEQ ID NO: 16)

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

- dominio CD3 zeta (secuencia de aminoácidos); (SEQ ID NO: 17)

RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE
GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

- dominio CD3 zeta (secuencia de aminoácidos; Secuencia de Referencia de NCBI NM_000734.3); (SEQ ID NO:99)

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE
GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

El nucleótido que codifica el polipéptido de SEQ ID NO:11 se proporciona como SEQ ID NO: 4. El nucleótido que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 12 se proporciona como SEQ ID NO: 5. El nucleótido que codifica el polipéptido de SEQ ID NO:13 se proporciona como SEQ ID NO: 6. El nucleótido que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 14 se proporciona como SEQ ID NO: 7. El nucleótido que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 15 se proporciona como SEQ ID NO: 8. El nucleótido que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 16 se proporciona como SEQ ID NO: 9. El nucleótido que codifica el polipéptido de SEQ ID NO:17 se proporciona como SEQ ID NO: 10. El nucleótido que codifica el polipéptido de SEQ ID NO:1 se proporciona como SEQ ID NO: 18. El nucleótido que codifica el polipéptido de SEQ ID NO:2 se proporciona como SEQ ID NO: 19. El nucleótido que codifica el polipéptido de SEQ ID NO:3 se proporciona como SEQ ID NO: 20. El nucleótido que codifica el polipéptido de SEQ ID NO:99 se proporciona como SEQ ID NO: 100.

Ejemplo 4: Designaciones de CDR pronosticadas para el CAR EGFRvIII

Las designaciones de CDR predichas para el CAR EGFRvIII bajo Kabat son las siguientes:

- VH:

EIQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIED**DYYIH**WVKQRTEQGLEWIGRIDPEN
DETKYGPIFQGRATITADTSSNTVYLQLSSLTSEDTA VYYCAFR**GGVY**WGP GTT
LTVSS; (SEQ ID NO: 21);

en donde CDR1 es DYYIH (SEQ ID NO: 22), CDR2 es RIDPENDETKYGPIFQG
(SEQ ID NO: 23), y CDR3 es RGGVY (SEQ ID NO: 24).

- VL:

DVVMTQSPLTSLVAIGQSASISCKSS**QSLLDSDGKTYLN**WLLQRPQGSPKRLISL
VSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGIYYC**WQGT**H**FP**GTFGGGTKLEIK;
(SEQ ID NO: 25);

en donde CDR1 es KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO: 26), CDR2 es LVSKLDS (SEQ ID NO: 27), y CDR3 es WQGT HFP GT (SEQ ID NO: 28).

Las designaciones de CDR predichas para el CAR EGFRvIII bajo Chothia son las siguientes:

- VH:

EQQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIEDYYIHVVKQRTEQGLEWIGRIDPEN
DETKEYGPIFQGRATITADTSSNTVYLQLSSLTSEDTAVYYCAFRGGVYWGPGTT

5 LTVSS; (SEQ ID NO: 29);

en donde CDR1 es GFNIEDY (SEQ ID NO: 30), CDR2 es DPENDE (SEQ ID NO:
31), y CDR3 es RGGVY (SEQ ID NO: 32).

10 • VL:

DVVMTQSPLTSLVAIGQSASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLISL
VSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGIYYCWQGTHTFPGTFGGGTKLEIK;
15 (SEQ ID NO: 33);

en donde CDR1 es SQSLLDSDGKTY (SEQ ID NO: 34), CDR2 es LVS (SEQ ID NO: 35), y CDR3 es GTHFPG (SEQ ID
NO: 36).

20 Ejemplo 5: Humanización de anticuerpo anti-EGFRvIII murino

La humanización del anticuerpo EGFRvIII murino se desea para el entorno clínico, en que los residuos específicos para
25 ratón pueden inducir una respuesta antígeno-anti-ratón- humana (HAMA) en pacientes que reciben tratamiento con
células T transducidas con la construcción de CAR murina. Las secuencias VH y VL del anticuerpo EGFRvIII murino
derivado de hibridoma se extrajeron de la bibliografía publicada (Morgan et al. (2012) Human Gene Therapy, 23: 1043-
1953, Supra). La humanización se realizó injertando regiones CDR del anticuerpo EGFRvIII murino en marcos de aceptor
de la línea germinal humana VH1_1-f o VH5_5a, así como VK2_A17 o VK4_B3 (base de datos vBASE). Además de las
30 regiones CDR, varios residuos marco, es decir, VK2 n° 36, n° 49, VK4 n° 2, n° 36, n° 46, n° 49, VH1 n° 2, n° 24, n° 76, n°
94 y VH5 n° 2, n° 24, n° 73, n° 76, n° 94, se pensaba que apoyaban la integridad estructural de las regiones CDR que se
conservaron de la secuencia murina.

Además, los elementos J humanos JH6 y JK4 se utilizaron para la cadena pesada y ligera, respectivamente. Las
35 secuencias de aminoácidos resultantes del anticuerpo humanizado se designaron VK2_A17/Hz1 y VK4_B3/Hz1 para las
cadenas ligeras y VH1_1-f/Hz1, VH5_5-a/Hz1 para las cadenas pesadas mostradas en la Figura 9. La numeración de los
residuos sigue a Kabat (Kabat E.A. et al, 1991, supra). Para las definiciones de CDR, se utilizaron tanto Kabat como
Chothia et al, 1987 supra). Los residuos marco retenidos de EGFRvIII de ratón se muestran en negrita/cursiva, los residuos
de CDR están subrayados.

40 En base a las secuencias de cadena ligera y pesada humanizadas como se muestran en la Figura 9, se utilizó un total de
8 combinaciones marco para generar scFv solubles para una validación adicional. El orden en que aparecen los dominios
VL y VH en el scFv fue variado (es decir, orientación VL-VH o VH-VL), y cuatro copias de la subunidad "G4S" (SEQ ID
NO: 37), en que cada una de las subunidades comprende la secuencia GGGGS (SEQ ID NO: 37) que se utilizó para
45 conectar los marcos. La Figura 9 describe las CDRs en las secuencias VH y VL calculadas por Kabat et al y Chothia et
al. (Supra).

Clonación:

50 Se obtuvieron secuencias de ADN que codifican los dominios VL y VH de ratón y humanizados, y los codones para las
construcciones se optimizaron para la expresión en células de Homo sapiens.

Las secuencias que codifican los dominios VL y VH se subclonaron en vectores de expresión adecuados para la secreción
en células de mamífero. Los elementos del vector de expresión incluyen un promotor (potenciador-promotor de
55 citomegalovirus (CMV)), una secuencia señal para facilitar la secreción, una señal de poliadenilación y un terminador de
la transcripción (gen de la Hormona de Crecimiento Bovina (BGH)), un elemento que permite la replicación episomal y la
replicación en procariotas (p. ej., origen SV40 y ColE1 u otros conocidos en la técnica) y elementos para permitir la
selección (gen de resistencia a ampicilina y marcador de zeocina).

60 Ejemplo 6: Caracterización de fragmentos scFv anti-EGFRvIII soluble humanizados

Se generaron fragmentos de scFv solubles arriba descritos utilizando técnicas estándar de biología molecular. Estos scFv
solubles se utilizaron en estudios de caracterización para examinar la estabilidad, la expresión de la superficie celular y
las propiedades de unión de los scFvs.

65 Expresión y purificación de scFv

Para la transfección de cada una de las construcciones de scFv, se transfectaron aproximadamente 3e8 células 293F con 100 µg de plásmido utilizando PEI como reactivo de transfección en la relación de 3:1 (PEI:DNA). Las células se cultivaron en 100 ml de medio de expresión EXPi293 (Invitrogen) en un matraz agitador a 37°C, 125 rpm, 8% de CO₂. El cultivo se recogió después de seis días y se utilizó para la purificación de proteínas.

Se recogieron células 293F centrifugando a 3500 g durante 20 minutos. El sobrenadante se recogió y se filtró a través de la Unidad de Filtro VacuCap90 PF (con súper membrana de w/0,8/0,2 µm, PALL). Alrededor de 400 µl de perlas de agarosa Ni-NTA (Qiagen) se añadieron al sobrenadante. La mezcla se hizo girar y se incubó durante 4 h a 4°C. Se cargó en una columna de purificación y se lavó con tampón de lavado con Histidina 20 mM. La proteína se eluyó con 500 µl de tampón de elución con Histidina 300 mM. Las muestras se dializaron contra tampón PBS a 4°C durante la noche. Las muestras de proteínas se cuantificaron utilizando nanodrop 2000c.

CE₅₀ mediante FACS que se une a scFv's purificados a células que expresan EGFR humano de tipo salvaje o EGFRvIII

Se llevaron a cabo los siguientes experimentos para demostrar que todas las variantes scFv EGFRvIII humanizadas tienen una unión equiparable a EGFRvIII, pero no se unen a EGFR de tipo salvaje.

Las células en suspensión HEK293F se transfectaron transitoriamente con hEGFR de tipo salvaje o hEGFRvIII y se cosecharon 2 días después de la transfección. Aproximadamente 5e5 células/pocillo se transfirieron a una placa BD Falcon de 96 pocillos. Las células se centrifugaron a 900 rpm (centrífuga Sorval Legend XT) durante 3 minutos. Se separó el sobrenadante. Las muestras de proteína scFv anti-EGFRvIII se diluyeron en DPBS con FBS al 5%. Las muestras se añadieron a los pocillos, se mezclaron y se incubaron durante 1 hora. Las células se lavaron dos veces en el DPBS con FBS al 5%. Las células se incubaron con anti-poli His PE (R&D) durante 1 hora, se lavaron dos veces antes del análisis FACS (LSRII de BD Biosciences).

Se determinó que la CE₅₀ de scFv de ratón (m3C10) para hEGFRvIII era ~ 5 nM tal como se muestra en la Figura 10. Todas las variantes de scFv EGFRvIII humanizada mostraron valores de CE₅₀ en el intervalo de un solo dígito a doble dígito bajo nM CE₅₀ (5-50 nM), además, no se detectó una unión apreciable de las construcciones 2173 y 2174 a las líneas celulares que expresan EGFR de tipo salvaje, lo que indica un perfil de seguridad mejorado en comparación con 3C10 murino, tal como se muestra en la Figura 11. En base a estos estudios, el clon 2173 fue seleccionado para la caracterización clínica adicional, tal como se muestra en el Ejemplo 8.

Ejemplo 7: Construcciones de CAR EGFRvIII humanizadas

El ScFv a utilizar en las construcciones CAR finales se derivó de las secuencias marco humanizadas descritas en el Ejemplo 1. El orden en que aparecen los dominios VL y VH en el scFv fue variado (es decir, orientación VL-VH o VH-VL). Un enlazador (G4S)₄ (SEQ ID NO: 113) se utilizó para conectar los dominios variables para crear los scFvs mostrados en la Tabla 1.

Tabla 1. Construcciones de scFv EGFRvIII humanizadas mostrando la orientación VH y VL y la longitud del enlazador (La Tabla describe "G4S" como SEQ ID NO: 37)

ID de construcción	Longitud aa	anotación
108358	277	VH1-VK4, 4G4S
108359	277	VK4-VH1, 4G4S
108360	277	VH5-VK2, 4G4S
108361	277	VK2-VH5, 4G4S
107276	277	VH1-VK2, 4G4S
111046	278	VH5-VK4, 4G4S
111048	278	VK4-VH5, 4G4S
107277	277	VK2-VH1, 4G4S
107275		
mEGFRvIII 3C10	274	VH-VL, 3G4S+HM
EGFRvIII 139	269	VL-VH,

Las secuencias de los fragmentos scFv humanizados se proporcionan más adelante en la Tabla 2 (SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 74 y SEQ ID NO: 80). Estos fragmentos de scFv se utilizaron con secuencias adicionales, SEQ ID Nos: 13-17, para generar construcciones CAR

completas con SEQ ID NOs: SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 79 y SEQ ID NO: 85.

5 Todos estos clones contenían un cambio de residuo Q/K en el dominio de señal del dominio co-estimulante derivado de la cadena CD3zeta.

Tabla 2: Construcciones de CAR EGFRvIII humanizadas

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia
CAR 1		
dominio scFv de CAR1	38	<p>eiqlvqsgaevkkpgatvkiskgsgfniedyyihwvqqapgkglewmgridpendet kygpifqgrvtitadtstntvymelsslrsedtavyycfrggyvwgqgtvtvssggggsg ggsgggsgggsgsdvmtqspdslavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqqkpg qppkrlislvsldsgvpdrfsgsgsgtdfilitsslqaedvavyycwqgthfpgtfgggtkv eik</p>
dominio scFv de CAR1 nt	39	<p>gaaatccagctggccaatcgggagctgaggtcaagaagccgggagccaccgtcaagatct catgcaaggggtcgggattcaacatcgaggactactacattcactgggtgcagcaagctccg ggaaaaggcctggaatggatggcgagaatcgaccagaaaacgacgaaactaagtacgga ccgattttccaaggaagagtactatcacgccgatactcaaccaataccgtctacatggaac tgagctcgctccggtccgaagatactgcagtgtattactgtgcctttcgggaggggtgactg gggccaaggaactactgtcactgtctcgcaggaggcggagggtcgggaggaggcgggag cggaggcgggtgctcgggtggcgagggaagcgacgtggtgatgaccagtcctccggactc cctcgccgtgagcctcggagagaggcgactatcaattgcaagtcgtccagtcacttctgga ttccgatggtaaaacgtacctcaactggctgcagcaaaagccagggcagccaccaaacggt tgatctcccttggtccaaactggatagcggagtgccctgaccgcttctcgggtccggtagcgg gaccgacttcacctgacgatcagctcactgcaggcggaggacgtggcagtggtactactgct ggcagggaacccacttcctggcaccttggaggtggcaccaagggtggagatcaag</p>
scFv Soluble de CAR1 - nt	40	

		<p>atggccctccctgtcaccgccctgctgctccgctggctcttctgtccacgccgctcggcccg aatccagctggccaatcgggagctgaggtcaagaagccgggagccaccgtaagatctc atgcaaggggtcgggattcaacatcgaggactactacattcactgggtgcagcaagctccgg gaaaaggcctggaatggatgggcagaatcgaccagaaaacgacgaactaagtacggac cgatttccaaggaagagtactatcaccgccgatactcaaccaataccgtctacatggaact gagctcgtccgggtccgaagatactgcagtgattactgtgcctttcgggaggggtgtactgg ggccaaggaaactactgtcactgtctcgtcaggaggcggagggtcgggaggaggcgggagc ggaggcgggtggctcgggtggcggaggaagcgacgtggtgatgaccagtccccgactcc ctgccgtgagcctcggagagaggcgactatcaattgcaagtgtccagtcacttctggatt ccgatggtaaaacgtacctcaactggctgcagcaaaagccagggcagccacccaaacggtt gatctcccttgtgtccaaactggatagcggagtgctgaccgcttctcgggtccggtagcggg accgacttcaccctgacgatcagctcactgcaggcggaggacgtggcagtgactactgctg gcagggaaccacttcctggcaccttggagggtggcaccaggtggagatcaagggatcg caccaccatcaccatcatcatcac</p>
scFv Soluble de CAR1 - aa	41	<p><u>Malpytalllplallhaarpeiqlvqsgaevkpgatvkiscksgfniedyyihwvqqap</u> gkglewmgridpendetkygpifqgrvitadtstntvymelssrsedavyycafrggvy wgqgtvtvssgggsgggsgggsgggsgggsgdvmtqspdslavslgeratinckssqsl ldsdgktylnwlqqkpgppkrlislvsklsgvpdrfsgsgsgtdftltisslqaedvavy cwqgthfpgtfgggtkveikgshhhhhhhh</p>
CAR1- Completo-nt lentivirus	42	

		<p>atggccctccctgtcaccgacctgtgctccgctggctcttctgtccacgccgctcggcccg agatccagctggtgagtcgggagctgaagtcaaaaagcctggcgcaaccgtcaagatctcg tgcaaggatcaggggtcaacatcgaggactactacatccattgggtgcaacaggcaccggg aaaaggcctggagtggtgaggaggattgacccagaaaatgacgaaccaagtacggacc gatcttccaaggacgggtgaccatcacggctgacacttccactaacaccgtctacatggaact ctcgagccttcgctcggaagataccgcggtgtactactgcgcctttagagggtgagtactgg ggacaagggactaccgtcacgtgtcgtcaggtggcggaggatcaggcggaggcggctcc ggtggaggaggaagcggaggaggtggctccgacgtggtgatgacgcagtcaccggactcc ttggcggtagcctgggtgaacgcgccactatcaactgaagagctcccagagcttctgga ctccgatggaaagacttatctcaattggctgcaacagaagcctggccagccgccaagagac tcattctactggtgagcaagctgtagcggagtgccagatcggttttcgggatcgggctcag gcaccgactcacctgactatttctccctccaagccgaggatgtggcgtctactactgttg caggggactcacttccggggaccttcggtggaggcactaagtgagatcaaaaccactac cccagcaccgaggccacccacccggctcctaccatcgctccagcctctgtccctgcgtc cggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgcataccggggtcttgacttcgctgc gatatctacatttggggccctctggtggtacttgcggggtctgctgcttactcgtgatact ctttactgtaagcggctcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctcatgagcctgt gcagactactcaagaggaggacggctgtcatgcccgttccagaggaggaggaaggcgg ctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcag aaccagctctacaacgaactcaatcttggctggagagaggagtacgctgctggacaaggc gagaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcgagaaagaatcccaagagggc ctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagg ggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacca aggacacctatgacgctcttcatgacaggccctgccgcctcgg</p>
CAR1- Completo-aa	43	<p>malpvtallplalllhaarpeiqlvqsgaevkkpgatvkisksgsfnic<u>dyvih</u>wvqqap gkglewm<u>g</u><u>ridpendetkvgpifqgr</u>vtitadtstntvymelsslrsedtavvyca<u>frgg</u></p> <p><u>vywgqgttv</u>tvssggggsgggsgggsgggsgdvmtqspdslavslgeratinc<u>kss</u> <u>qslldsdgktyln</u>wlqqkpgqppkrlis<u>lvskl</u>ds gvpdrfs gsgsgtdflltisslqaedva vyy<u>cwqgthfpgt</u>fgggtkveikttppaprpptpaptiasqplsrlpeacrpaaggavhtrg ldfacdiyiwaplagtcgvlslvitlyckrgrklllyifkqpfmrvpvtqteedgcsrfpe eeeggcelrvkfsradapaykqqnqllynelnlgrreedydldkrrgrdpemggkprrk npqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalpp r</p>

CAR 2		
dominio scFv de CAR2	44	<p>dvvmtqspdslavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqqkpgppkrlislvskldsg vpdrfsghsgsgtdfltlisslqaedvavyycwqgthfpgtfgggkveikggsgggsgsg ggsggggseiqlvqsgaevkkpgatvkisckgsgfniedyyihwvqqapgkglewm gridpendetkygpifqgrvtitadtstntvymelsslrsedvavyycafirggywgqgtvt vss</p>
dominio scFv de CAR2 - nt	45	<p>gatgtcgtgatgaccagtcctccagactccctcgagtgctctgggagaacgggcccaccatc aactgcaaactcgagccagtcactgctggactcagacggaagacctcaactggctgca gcagaagcctggccagccaccgaagcgctgatctccctggtgtccaagctggactgggc gtcccggacaggttagcggtagcggctcgggaaccgacttactctgaccattagctcgtc caagctgaagatgtggcggctactactgctggcaggggaccacttccccgggacctttggc ggaggaaactaaagtcgaaatcaaaggaggaggcggatcaggtggaggaggcagcggagg aggaggaggcggcgggtggcggctccgaaattcaactgtgcaatccgggtgccgaggtgaag aaacctggtgccactgtcaagatctcgtgtaaggatcgggattcaatafcaggactactaca tccactgggtgcaacaggcggcaggaaaggattggagtgatgggtgcacgcgacccgga aacgatgagactaagtacggaccgatctccaaggccgggtcacgatcactgcggatacct ccactaataccgtgtatattggagctctcgtcactgagaagcgaagatacggccgtgtactactg cgacttcagaggaggtgtgtactggggccagggaactactgtgaccgtgtcgtcg</p>

CAR2 - scFv Soluble - nt	46	<p>atggccctccctgtcaccgccctgtgcttcgctggctcttctgtctccacgccgctcgcccg atgtcgtgatgaccagtgccccagactccctcgcagtgctctgggagaacgggcccacatca actgcaaatcgagccagtcactgctggactcagacggaaagacctacctaactggctgcag cagaagcctggccagccaccgaagcgctgatctccctgggtgccaaagtggaactcgggcgt cccgacaggttagcggtagcggctcgggaaccgacttcactctgaccattagctcgtcca agctgaagatgtggcggctactactgctggcaggggaccacttccccgggaccttggcg gaggaaactaaagtcgaaatcaaaggaggaggcggtcaggtggaggaggcagcgaggga ggaggggagcggcggtggcggctccgaaattcaactgtgcaatccggtgccaggtgaaga aacctgggtccactgtcaagatctcgtgaagggtcgggattcaatcagggactactacat ccactgggtgcaacaggcgccaggaagggttggagtggtgggtgcacgcacccgga aaacgatgagactaagtacggaccgatctccaaggccgggtcacgatcactgcggatacct ccactaataccgtgtatatggagctctcgtcactgagaagcgaagatacggccgtgtactactg cgacttcagaggaggtgtgtactggggccagggaactactgtgaccgtgtcgtcggggtcac atcaccaccatcatcatcaccac</p>
CAR2 - scFv Soluble - aa	47	<p><u>malpvtalllplalllhaarpdvmtqspdslavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqq</u> kpgqppkrlislvskldgvpdrfsgsgsgtdfltlisslqaedvavyycwqgthfpgtfggg tkveikggggsgggsgggsgggsgggseiqlvqsgaevkpgatvkisckgsgfniedyyi hwwqqapgkglewmgridpendetkygpifqgrvtitadtstntvymelsslrsestavy <u>ycafrggvywgqgtvtvssgshhhhhhhh</u></p>

<p>CAR2 Completo - nt</p>	<p>- 48</p>	<p>atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgtccacgccgctcgcccg acgtggatgactcaaagcccagattccttggtgtctcccttgagaaaagagcaacgatcaa ttgcaaaagctcgcagtcctgttgactccgatgaaaaacctacctcaactggctgcagca gaagccgggacaaccaccaaagcggtgattccctcgtgtccaagctggacagcgcgctg ccggatcgttctcgggcagcggctcggaaccgatttactctcactatttcgtcactgcaagc ggaggacgtggcggtgtattactgctggcagggcactcactcccgggtacttttggaggagg taccaaagtcgaaatcaagggtggagggcgaggagggagggcggtcgaggaggga ggatcgggtggcgagggtcagaaatccagctgggtgcagtcaggtgccgaagtgaagaag cctggggccacggtgaagatctcgtgcaaggggagcggattcaacatcaggattactacat ccattgggtgcaacagccccctggcaaagggtggaatggatgggaaggtacgacccga gaatgacgagactaagtacggccgatcttccaaggacgggtgacctcactgcagacactt caaccaacaccgtctacatggaactctcctcgtgcgtccgaggacaccgccgtgtactact gtgcttcagaggaggagtctactggggacaggggaacgaccgtgacctgcagctcaaccact acccagcaccgaggccaccaccccggtcctaccatcgctccagcctctgtccctgcg tccggaggcatgtagaccgcagctgggtggggccgtgcataccggggtcttacttcgcct gcgatatctacatttggggccctctggctggtacttgcggggtcctgctgcttactcgtgatca ctcttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatcttaagcaaccctcatgaggcct gtgcagactactcaagaggagcagcgtgtcatgccgggtccagaggagggaagggc gctgcgaactgcgctgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggca gaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgactgctgacaagc ggagaggacgggaccagaaatggcggggaagccgcgagaagaatcccaagaggg cctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaag gggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacc aaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg</p>
<p>CAR2- Completo-aa</p>	<p>49</p>	<p>malpvtalllplallhaarpdvmtqspdslavslgeratinc<u>kssqsllds</u><u>dgktyln</u>wlq qkpgqppkrlis<u>lvsklds</u>gvprdfsgsgsgtdfilitisslqaedvavyyc<u>wqgthfpgtfg</u> ggtkveikggggsgggsgggsggggseiqlvqsgaevkkgpatvkisckgsgfnied <u>vyih</u>wvqqapgkglewmgr<u>ridpendetkvgpifqg</u>rvtitadtstntvymelsslrse tavyyca<u>frggvy</u>wqgttvvssttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaaggavhtrg ldfacdiyiwaplagtegvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgscrfpe ceeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreedyvldkrrrdpemggkprk npqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalpp r</p>

CAR 3		
dominio scFv de CAR3	50	<p>eiqlvqsgaevkkpgeslriscgsgfniedyyihwvrqmpgkglewmgridpendetk ygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtamyycfrggvywgqgtvtvssgggsg ggsgggsgggsgsdvmtqspslpvtlgqpasickssqslldsdgktylnwlqprpg qsprrlislvsklsgvpdrfsgsgsgtdfllkisirveadvgyvycwqgthfpgtfgggkv eik</p>
dominio scFv de CAR3 nt	51	<p>gagattcagctgggtccaaagcggcgagaaagtgaagccagggaatcgttcgcatca gctgtaaagggtccggtcaacatcgaggactattacatccattgggtcggcgagatccag gaaaggggctggaatggatgggacggattgacccggagaacgacgaaaccaagtacggac cgatctttcaaggacacgtgactatctcccgacaccagcatcaatacgggtgtacctcaatg gtcctcactcaaggcctcggataccgcgatgtactactgcgcgttcagaggaggcgtctactg gggacaagggactactgtgactgtctcatcaggaggtggaggaagcggaggagggtggctcg ggcggagggtggatcgggaggaggagggtccgatgtggtgatgacccagtccccactgtcgc tcccggtgacctcggacagcctgctagcatctcgtgcaaatcctcgcaatccctgtggactc ggacggaaaaacgtacctcaattggctgcagcagcgccctggccagagcccagagaaggctt atctcgctggtgtcaaagctggatagcgggtgtgcccgaccggttcagcggctcagggtcagg aaccgatttcacctgaagatctcccgctggaagccgaagatgtcggagtctactactgtgg cagggtactcacttccggggaccttgggtggcggcactaagggtcgagattaag</p>
CAR3 - scFv Soluble - nt	52	

		<p>atggccctccctgtcaccgccctgctgctccgctggctcttctgctccacgccgctcgcccg agattcagctgggtccaaagcggcgagaaagtgtgaaagccagggaatcgttgcgcacag ctgtaaagggtccggcttcaacatcgaggactattacatccattgggtgcggcagatgccagga aaggggctggaatggatgggacggattgacccggagaacgacgaaaccaagtacggaccg atctttcaaggacacgtgactatctccgacaccagcatcaatacgggtgtacctccaatggt cctcactcaaggcctcgataccgcatgtactactgcgcgttcagaggaggcgtctactggg gacaagggactactgtgactgtctcatcaggaggtggaggaagcggaggaggtgctcggg cggaggtggatcgggaggaggaggtccgatgtggtgatgaccagtcctcactgtcgtc ccggtgacctcggacagcctgtagcatctcgtgcaaatcctcgaatccctgtggactcg gacggaaaaacgtacctcaattggctgcagcagcgccctggccagagcccagaaggctta tctcgtggtgtcaaagctggatagcgggtgccccaccggttcagcggctcagggtcagga accgattcacctgaagatctcccgctggaagccgaagatgtcggagtctactactgtctggc agggtactcacttccggggaccttgggtggcggcactaagggtcagattaagggtcacacc atcatcaccatcaccaccac</p>
CAR3 - scFv Soluble - aa	53	<p><u>malpvtalllplallhaarpeiqlvqsgaevkkpgeslriscgsgfniedyyihwvrqmp</u> gkglewmgridpendetkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtamyycafrgg vywgqgtvtvssgggsgggsgggsgggsgggsgdvmtqspslpvtlgqpasisckss qslldsdgktylnwlqrrpgqsprrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveadvgy yycwqgthfpgtfgggtkveikgshhhhhhhh</p>

CAR3 Completo - nt	- 54	<p>atggccctccctgtaccgccctgtgcttccgtggctcttctgtccacgcgcgtcggcccg aatccagctgggtgcaaagcggagccgaggtgaagaagcccggaatccctgcgcacttc gtgtaagggttcggcctttaacatcgaggattactacatccactgggtgagacagatccggg caaaggctggaatggatgggcccgcacgacccggagaacgacgaaacaaatacggacc aatcttccaaggacatgtgactatttcgcggatactccatcaacactgtctacttgcaagtga gctcgctcaaggcgtcggataccgcatgtactactgcgcattcagaggaggtgtgtactggg gccagggcactacgggtcaccgtgtcctcgggaggtggagggtcaggaggcggaggctcgg gcgggtggaggatcaggcggaggaggaagcgatgtggtcatgactcaatccccactgtcact gcctgtcactctggggcaaccggcttccatctcatgaagcaagccaatcgctgctcactcc gacggaaaaacctacccaattggcttcagcagcggccaggccagtcgcctcggaggctgat</p> <p>ctcactcgtgtcgaagcttgactccgggggtgccggatcggtttagcgggaagcggatcgggga ccgacttcacgttgaaattagccgggtggaagccgaggacgtgggagtctattactgctggc aggggacccacttcccgggacttccggaggagcaccaaagtcgagattaagaccactac cccagcaccgaggccacccacccggctcctaccatcgctcccagcctctgtccctgcgtc cggaggcatgtagaccgcagctgggtggggccgtgcataccgggggtcttgacttcgctgc gatatctacatttggggccctctggctgggtacttgcgggtcctgctgctttcactcgtgatact ctttactgtaagcgggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccctcatgaggcctgt gcagactactcaagaggaggacggctgtcatgccggtcccagaggaggaggaaggcgg ctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggag aaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaaggc gagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgagaagaatcccaagagggc ctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagg ggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacca aggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg</p>
CAR3 Completo - aa	- 55	

		malpvtalllplallhaarpeiqlvqsgaevkkpgeslrisccksgsfnie <u>dyvih</u> wvrqmp gkglewm <u>g</u> <u>ridpendetkygpifqgh</u> hvtisadtsintvylqwsslkasdtamyycafr <u>g</u> <u>gv</u> ywgqgttvvssggsgsgsgsgsgsgsgsgsdvmtqsplslpvtlgqpasisc <u>ks</u> <u>sqslldsdgktyln</u> wlqrrpgqsprrlis <u>lvsklds</u> gvprdrfsrgsgsgtdftlkisrveadv gvyy <u>cwqgthfpgt</u> fgggtkveikttpprptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtr gldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfp eeeeggcclrvkfsrsadapaykqgnqlynelnlgrreedyvldkrrgrdpemggkpr knpqeglynelqkdkmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalp pr
CAR 4		
dominio scFv de CAR4	56	dvmtqsplslpvtlgqpasiscssqslldsdgktylnwlqrrpgqsprrlislvskldsgv prdrfsrgsgsgtdftlkisrveadvgvyy <u>cwqgthfpgt</u> fgggtkveikggsgsgsgsg ggsgsgsgseiqlvqsgaevkkpgeslrisccksgsfnieyyihwvrqmpgkglewm ridpendetkygpifqghvtsadtsintvylqwsslkasdtamyycafrggywgqgttv tvss
dominio scFv de CAR4 nt	57	gacgtcgtcatgaccagagcccgctgctactgcctgtgaccctgggcccagccggcgtccat tagctgcaaatcctcgcaatccctgctgactcagacgaaaaacgtactgaactggctccaa cagcgccctgggcaatcccaaggcggttatctactcgtcagcaagctcgatagcgggtgc ccagacagatttccggctcgggatcgggcactgattcactctgaagatctcgcggtggaa ggcgaggatgtgggagtgtactattgctggcagggcactcacttccccgggacgttggcg aggaaactaaggctgagatcaaaggaggaggtggatcaggcggaggtggagcggaggag gaggaagcgggtgggaggttcgaaatccagctggtgcaatcaggagccgaggtgaaga agccgggagaaatccctgcgcactcgtgcaagggtcgggcttcaacatcaggattactac atccactgggtcggcagatccgggaaagggttggaatggatgggacgcattgacccgg aaaatgatgaaacaaatacgggccaatctccaaggccacgtgaccattagcgtgacatt ccatcaacaccgtgtacctcagtggtcctcactgaaggcgtcggacactgcatgtactactg tgattcagaggaggggtctactggggacagggcaccaccgtgaccgtgagctcc
CAR4 - scFv Soluble - nt	58	

		<p>atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcgcccg acgtcgtcatgaccagagcccgctgtcactgctgtgacctgggcccagccggcgtccatta gctgcaaactcctcgcaatccctgctcgactcagacggaaaaacgtacttgaactggctcaac agcgccctgggcaatccccaaggcggcttatctcactcgtcagcaagctc gatagcgggtgcc cagacagattttcgggctcgggatcgggcactgatttactctgaagatctcgcggtggaag ccgaggatgtgggagtgtactattgctggcagggcactcacttccccgggacgtttggcgga ggaactaaggctgagatcaaaggaggaggtggatcaggcgagggtggagcggaggagg aggaagcgggtgggaggttccgaaatccagctggtgcaatcaggagccgaggtgaagaa gccgggagaatccctgcgcactcgtgcaagggtcgggcttcaacatcgaggattactacat ccactgggtgcggcagatgccgggaaagggttggatggatgggacgcattgacctgga aatgatgaaacaaatacgggccaatctccaaggccacgtgaccattagcgtgacacttc catcaacaccgtgtaccttcagtggctcactgaaggcgtcggacactgccatgtactactgt gcattcagaggaggggtctactggggacagggcaccaccgtgaccgtgagctccggctcgc atcaccatcatcaccaccatcac</p>
CAR4 - scFv Soluble - aa	59	<p><u>malpvtalllplalllhaar</u>pdvmtqspislptlgqpasisckssqslldsdgktylnwlqq rpgqsprrlislvsldsgvpdrfsqsgsgtdflkisirveacdvgvyycwqgthfpgtfggg tkveikgggsgggsgggsgggsgggseiqlvqsgaevkkpgeslrisksgsfniedyyi hwvrqmpgkglewmgridpendetkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtam yycafrggvywgqgtvtvssgshhhhhhhh</p>
CAR4 Completo - nt	- 60	

		<p>atggccctccctgtcaccgccctgctgctccgctggctcttctgctccacgccgctcgccccg acgtcgtcatgaccaatcccctctctccctgccggtcacctgggtcagccggcgctcatctc atgcaaaagctcacagtccctgctggattcgacggaaaaacctacttgaactggctccaaca gaggccgggtcagtcacctcgagactgatctcgctggtagcaagctcgactcggtgtgc cggatcggttctccgggtcaggatcgggcaccgactttacgtcaagatttcgagagtggagg ccgaggatgtgggagtgtactattgctggcagggcacgcatttccccgggacatttggaggc gggactaagggtggaatcaaggagggtggcgatcaggcggaggaggcagcggcgagg gtggatcaggaggcggagggtcagatccagctggtccaaagcggagcagaggtaaga agccaggcagtgcccttcgatttctgcaaaggagcggcttcaacattgaagattactacat ccactgggtgcggcaaatgccaggaaagggtctggaatggatggacggatcgaccaga aatgatgaaactaagtacggaccgatctccaaggacacgtcactatctccgggacacttc gatcaacaccgtgtacctccagtggagcagcttgaaagcctccgacaccgctatgtactactgt gccttcccgaggaggtctactggggacaggggactactgtgacctgtcgtccaccactac cccagcaccgaggccaccaccccggtcctaccatcgctccagcctctgtccctgcgtc cggaggcatgtagaccgcagctgggtgggcccgtgcataccggggtcttgacttcgctgc gatattctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgcttctactcgatcact ctttactgtaagcgggtcggaagaagctgctgtacatcttaagcaaccctcatgaggcctgt gcagactactcaagaggaggacggctgtcatgccggtcccagaggaggaggaaggcgg ctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcag aaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgactgctggacaagcg gagaggacgggaccagaaatggcggggaagccgcgagaagaatccccagagggc ctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagg ggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacca aggacacctatgacgtcttcatatgcaggccctgccgcctcgg</p>
CAR4 Completo - aa	- 61	<p>malpvtalllplalllhaarpdvmtqspslpvtlgqpasisckssqslldsdktylnwlq qrpqgsprrlislvskldsgvpdrrfsrgsgsgtdftlkisrveadvgyyycwqgthfpgtfg ggtkveikggggsgggsgggsgggsgggseiqlvqsgaevkkgpesslriscgsgfniedy yihwvrqmpgkglewmgridpendetkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasd tamyycafrggvywgqgttvtssttpaprpptpaptiasqplsIrpeacrpaaggavhtr gldfacdiyiwaplagtcgvlslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqtqeedgcsrfp eeeeggcelrvkfsrsadapaykqqnqlynelnlgrreedydldkrrrdpemggkpr knpqeglynclqdkmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalp pr</p>
CAR 5		

dominio scFv de CAR5	62	<p> eiqlvqsgacvkkpgatvkiscksgfniedyyihwvqqapgkglewmgridpendet kygpifqgrvtitadtstntvymelsslrsedtavyycfrggvywqggtvtvssgggsg gggsgggsgggsgdvmtqspislpvtlgqpasickssqslldsdgktylnwlqrrpg qsprllislvskldsgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveadvgyvycwqgthfpgtfgggtkv eik </p>
dominio scFv de CAR5 nt	63	<p> gaaatccagctcgtgcagagcggagccgaggtcaagaaaccgggtgctaccgtgaagattt catgcaaggatcgggcttcaacatcaggattactacatccactgggtgcagcaggcacca ggaaaaggacttgaatggatgggcccgcgcacccggaaaatgacgagactaagtacggcc ctatctccaaggacgggtgacgatcaccgcagacactagcaccaacaccgtctatatggaac tctcgtccctgaggtccgaagatactgccgtgtactactgtgcgtttcgcggaggtgtactgg ggacagggtaccaccgtcacgtgtcatcgggcgggtggaggtccgggtggaggagggtca ggaggcgggtggaagcggaggaggcggcagcgacgtggtcatgactcaatgccgtgtcg ctgcccgtcactctgggacaaccgcgtccatcagctgcaaatcctcgcagtcactgcttgact ccgatggaaagacctacctaactggctgcagcaacgccaggccaatcccaagacgcct gatctcgttggtgtcaaagctggactcaggggtgccggaccggttctccgggagcgggtcgg gcacggatttactctcaagatctccagagtgaagccgaggatgtgggagtctactactgct ggaggggaacccatttccctggaacttttggcggagggaactaaggctcagattaaa </p>
CAR 5 - scFv Soluble - nt	64	<p> atggccctccctgtcaccgccctgtgcttccgtggctcttctgtccacgccgctcgcccg aaatccagctcgtgcagagcggagccgaggtcaagaaaccgggtgctaccgtgaagatttca tgcaaggatcgggcttcaacatcaggattactacatccactgggtgcagcaggcaccagg aaaaggacttgaatggatgggcccgcgcacccggaaaatgacgagactaagtacggccct atctccaaggacgggtgacgatcaccgcagacactagcaccaacaccgtctatatggaactc tcgtccctgaggtccgaagatactgccgtgtactactgtgcgtttcgcggaggtgtactggg gacagggtaccaccgtcacgtgtcatcgggcgggtggaggtccgggtggaggagggtcag gaggcgggtggaagcggaggaggcggcagcgacgtggtcatgactcaatgccgtgtcgc tgcccgtcactctgggacaaccgcgtccatcagctgcaaatcctcgcagtcactgcttgactc cgatggaaagacctacctaactggctgcagcaacgccaggccaatcccaagacgcctg atctcgttggtgtcaaagctggactcaggggtgccggaccggttctccgggagcgggtcggg caggatttactctcaagatctccagagtgaagccgaggatgtgggagtctactactgctg gcagggaacccatttccctggaacttttggcggagggaactaaggctcagattaaaggagcc accatcatcaccaccaccac </p>

CAR 5 - scFv Soluble - aa	65	<p><u>malpvtallplalllhaarpeiqlvqsgacvkkpgatvkisksgsfniedyyihwvqqap</u> gkglewmgridpendetkygpifqgrvitadtstntvymelssrsedtavyycafrggvy wgqgttvsvssggsgsgsgsgsgsgsgsdvmtqslslpvtlgqpasickssqsl ldsdgktylnwlqqrpgqsprrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveadvgvyy cwqgthfpgtfgggtkveikgshhhhhhhh</p>
CAR5 Completo - nt	- 66	<p>atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgtccacgccgctcgcccg aaatccagctcgtgcagagcggagccgaggtcaagaaaccgggtgctaccgtgaagattca tgcaagggatcgggcttcaacatcgaggattactacatccactgggtgcagcaggcaccagg aaaaggactgaatggatgggcccggatcgaccggaaaatgacgagactaagtacggccct atctccaaggacgggtgacgatcaccgcagacactagcaccaacacgcgtctatatggaactc tcgtccctgaggtccgaagatactgccgtgtactactgtgcgtttcgcggaggtgtgtactggg gacaggggtaccaccgtcaccgtgtcatcgggcgggtggaggctccggtggaggaggggtcag gagggcgtggaagcggaggaggcgcgcagcgacgtggtcatgactcaatcgccgctgtcgc tgcccgtcactctgggacaacccgcgtccatcagctgcaaactctcgagtcactgttgactc cgatggaaagacctacctcaactgggtgcagcaacgccagggcaatcccaagacgcctg atctcgttggtgtcaaagctggactcaggggtgccggaccgggttctcgggagcgggtcggg cacggatttactctcaagatctccagagtgaagccgaggatgtgggagtctactactgtg gcagggaaacccatttcctggaactttggcggaggaaactaagtcgagattaaaaccactac cccagcaccgaggccacccaccccggtcctaccatcgctcccagcctctgtccctcgctc cggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgcataccggggtcttgacttcgctgc gatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcact ctttactgtaagcgggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccctcatgaggcctgt gcagactactcaagaggaggacggctgtcatgccggtcccagaggaggaggaaggcgg ctgcgaactgcgctgaaattcagccgcagcgcagatgctcagcctacaagcaggggcag aaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcg gagaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcgagaagaatcccaagagggc ctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagg ggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacca aggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg</p>
CAR5 Completo - aa	- 67	

		malpvtalllplalllhaarpeiqlvqsgaevkkpgatvkisksgsfni <u>edvvi</u> hwwqqap gkglewmgr <u>idpendetkypifqgr</u> vtitadtstntvymelsslrsedtavyycafr <u>gg</u> <u>vy</u> wgqgtvtvssgggsgggsgggsgggsgggsgdvmtqspslpvtlgqpasisc <u>kss</u> <u>qsllds</u> dgktylnwlqrrpgqsprrlis <u>lvsklds</u> gvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaevg vyye <u>wqgthfpgt</u> fgggtkveikttpprptpaptiasqplsrpeacrpaaagavhtrg ldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfe eeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrrceydvlkrrgrdpemggkprk npqeglynelqkdkmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalpp r
CAR 6		
dominio scFv de CAR6	68	eiqlvqsgaevkkpgeslriscksgsfni <u>edy</u> ihwvrqmpgkglewmgridpendetk ypifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtamyycafrggyvwgqgtvtvssgggsg ggsggggsgggsgdvmtqspdslavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqqkp qppkrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdftltisslqaedvavyye <u>wqgthfpgt</u> fgggtkv eik
dominio scFv de CAR6 nt	69	gaaatccagctggtgcagtcaggcgccgaggtcaagaagccgggagagtcgctgagaatct cgtgcaagggctcggggttaacatcgaggactactacattcactgggtcaggcagatgccg ggaaagggactggaatggatgggcccgatcgaccagaaaatgacgaaaccaaatcggg ccgattttcaaggccacgtgactatcagcgagacacgagcatcaaacctgtctacctccagt ggctctcgcttaaggccagcgataccgctatgtactactgcgcattcagaggcggggtgtact ggggacaagggaacctgtgaccgtgagcagcggaggtggcggtcgggaggaggtggg agcgggaggagaggttcggcggtggaggatcagatgtcgtgatgaccagtcctccggact ccctcgctgtctcactggcgagcgcgcgaccatcaactgcaaatcgagccagtcgctgttg gactccgatggaagacttatctgaattggctgcaacagaaccaggacaacctcccaagcg gctcatctcgctgtgtcaaaactcgattcgggagtgccagaccgcttctcggggtccgggag cggaactgactttactttgaccatttctcactgcaagcggaggatgtggccgtgtattactgttg gcagggcacgcatttccctggaaccttcggtggcggaactaaggtggaaatcaag
CAR6 - scFv Soluble - nt	70	

		<p>atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgtccacgccgctcgcccg aatccagctgggtgcagtcaggcgccgaggtcaagaagccgggagagtcgctgagaatctc gtgcaagggtcgggggttaacatcaggactactacattcactgggtcaggcagatgccgg gaaagggtggaatggatgggcccggatcgaccagaaaatgacgaaaccaatacgggc cgattttcaaggccacgtgactatcagcgcagacacgagcatcaacactgtctacctccagt gtcctcgcttaaggccagcgataccgctatgtactactgcgcattcagaggcgggtgtactg gggacaaggaaccactgtgacctgagcagcggaggtggcggtcgggaggaggtggga gaggaggaggtccggcggtggaggatcagatgtcgtgatgacctcagccggactc cctcgtgtctcactggcgagcgcgcaccatcaactgcaaatcagccagtcgctgttg actccgatggaaagacttatctgaattggctgcaacagaaccaggacaacctccaagcgg ctcatctcgttgtgcaaaactcgattcgggagtgccagaccgcttctcggggtccgggagc ggaactgactttactttgaccttctcactgcaagcggaggtgtggccgtgtattactgttg cagggcacgcatttccctggaaccttcggtggcggaactaagggtggaatcaagggtacaca ccaccatcatcaccatcaccaccat</p>
CAR6 - scFv Soluble - aa	71	<p><u>malpvtalllplalllhaarpeiq</u>lvqsgaevkkgpesslrisksgsfniedyihwvrqmp gkglewmgridpendetkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtamyycafrgg vywgqgtvtvssgggsgggsgggsgggsgggsgdvmtqspdslavslgeratinckss qslldsdgktylnwlqqkpgppkrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdflttisslqaedvav yycwqgthfpgtfgggtkveikgshhhhhhhh</p>

<p>CAR6 Completo - nt</p>	<p>- 72</p>	<p>atggccctccctgtaccgccctgctgcttccgctggctcttctgtccacgccgctcgcccg agattcagctcgtgcaatcgggagcggaagtcaagaagccaggagagtccttgcggatctca tgcaagggtagcggctttaacatcgaggattactacatccactgggtgaggcagatgccggg gaagggactcgaatggatgggacggatcgaccagaaaacgacgaaactaagtacggctc gatcttcaaggccatgtgactattagcggcgatacttcaatcaataccgtgtatctgcaatggc ctcattgaaagcctcagataccgcatgtactactgtgctttcagaggaggggtctactgggga cagggaaactaccgtgactgtctcgtccggcgaggcgggtcaggaggtggcggcagcgga ggaggaggggtccggcgagggtgggtccgacgtcgtgatgaccagagccctgacagcctg gcagtgagcctgggcgaaagagctaccattaactgcaaatcgtcgagagcctgctggactc ggacggaaaaacgtacctcaattggctgcagcaaaagcctggccagccaccgaagcgctt atctcactggtgtcgaagctggattcgggagtgcccgatcgttctccgctcgggatcggt actgacttcacccctcactatctcctcgcttcaagcagaggacgtggccgtctactactgctggca gggaaccactttccgggaaccttcggcgaggggacgaaagtggagatcaagaccactacc ccagcaccgagggccaccacccggctcctaccatcgctccagcctctgtccctgcgtcc ggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgcataccggggtcttgacttcgctgcg atatctacatttggccccctctggctggtacttgcgggtcctgctgctttcactcgtgactct ttactgtaagcgggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccttcatgaggcctgtg cagactactcaagaggagggagcgtgtcatgccggtccagaggaggaggaaggcggt gcgaactgcgctgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcaga accagctctacaacgaactcaatcttgctcgagagaggagtacgacgtgctggacaagcgg agaggacgggaccagaaatggcggggaagccgcgagaagaatcccaagagggcct gtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagg gaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacca ggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg</p>
<p>CAR6 Completo - aa</p>	<p>- 73</p>	<p>malpvtalllplalllhaarpeiqlvqsgaevkpkgeslrisksgsfnie<u>dyvih</u>wvrqmp gkglewm<u>gridpendetkygpifqgh</u>vtisadtsintvylqwsslkasdtamyyca<u>rg</u> <u>gvv</u>wgqgttvvssgggsgggsgggsgggsgggsvvmtqspdslavslgeratin<u>ks</u> <u>sqsllds</u><u>dgktyln</u>wlqqkpgqppkrlis<u>lvsklds</u>gvpdrfsgsgsgtdftltisslqaedv avyyc<u>wqgthfpgt</u>fgggtkveikttppaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtr gldfacdiyiwaplagtcgvlslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqtteedgescrfp eeeeggcelrvkfsrsadapaykqqnqlynelnlgrreedyvldkrrgrdpemggkpr knpqeglynelqdkmacayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalp pr</p>

CAR 7		
dominio scFv de CAR7	74	<p>dvvmtqspdslavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqqkpgqppkrlislvskldsg vpdrfsqsgsgtdflttisslqaedvavyycwqgthfpgtfgggtkveikgggsgggsgg gggsggggseiqlvqsgaevkkpgeslriscksggfniedyihwvrqmpgkglewmg ridpendetkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtamyycfrggvywgqgttv tvss</p>
dominio scFv de CAR7 nt	75	<p>gacgtggtgatgaccaatcgccagattccctggcagtgccctggggaacgcgccactatt aactgcaaatcgtcacagtccttgcttgattccgacggaaagacctacctaattggctccagc agaagccaggacaaccgccaagagactgatctccctgggtgcaagctggactcgggagt gcctgatcggttcctcgggtagcgggagcggcaccgacttcactctgaccatctcgtcactcca ggctgaggacgtggccgtgtattactgttgccagggtactcactttccgggactttcggaggc ggcaccaaggtggagattaaggaggaggcggaaagcggaggtggaggatcgggaggtgg tgggagcggcggaggaggagcgagatccagctcgtccaatcgggagcggaaagtgaaga agcccggagagtcacttagaatctcatgcaagggtcgggctcaacatcaggattactaca tcattgggtccgccagatgcctggtaaaggactggaatggatggggaggattgaccggaa aacgacgaaactaagtacggaccgatcttcaagggcacgtgactatctccgtgatacctca atcaatactgtctacctccagtggtcctcgtgaaagcaagcgacaccgcgatgtactactgcg cctccggggaggagtgtactggggccaaggcaccacggtcacggtcagctcc</p>
CAR7 - scFv Soluble - nt	76	

		<p>atggccctccctgtcaccgcctgctgctccgctggctcttctgtccacgccgctcggcccg acgtgggtgatgaccaatgccagattccctggcagtgccctgggcgaacgcgccactatta actgcaaatgtcacagtccttgcttgattccgacggaaagacctacctcaattggctccagca gaagccaggacaaccgccaagagactgatccctggtgtcaaagctggactcgggagtg cctgatcgggtctcgggtagcgggagcggcaccgacttcactctgacctctcgtcactccag gctgaggacgtggccgtgtattactgttgccagggtactcactttccgggcactttcggaggcg gcaccaaggtggagattaaaggaggagggcgaagcggaggtggaggatcgggaggtggt gggagcggcggaggaggagcgagatccagctcgtccaatcgggagcggaaaggaagaa gcccgagagtcacttagaatctcatgcaaggggtcgggctcaacatcaggattactacat ccattgggtccgccagatgcctggttaaaggactggatggatgggaggattgaccggaa aacgacgaaactaagtacggaccgatcttcaagggcacgtgactatctccgtgatacctca atcaatactgtctacctccagtggtcctcgtgaaagcaagcgacaccgcgatgtactactgcg cctccggggaggagtgactggggccaaggcaccacggtcacggtcagctccggctccca tcaccaccaccatcaccatcatcac</p>
CAR7 - scFv Soluble - aa	77	<p><u>malpvtalllplalllhaar</u>pdvmtqspdslavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqq kpgqppkrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdfiltisslqaedvavyycwqgthfpgtfggg tkveikgggsgggsgggsgggsgggseiqlvqsgevkpkgeslrisksgsfniedyyi hwvrqmpgkglewmgridpendetkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtam yycafrggvywgqgtvtvssgshhhhhhhhhh</p>

<p>CAR7 Completo - nt</p>	<p>- 78</p>	<p>atggccctccctgtaccgccctgctcttcgctggctcttctgtccacgccgctcgcccg acgtggtgatgactcagtcgcctgactcgtggctgtgtcccttgagagcgggccactatca attgcaagtcacccagtcgctgctggattccgacgggaaaacctacccaattggctgcagca aaaaccgggacagcctccaaagcggctcatcagcctggtgtccaagttggacagcggcgtg ccagaccgcttctccggttcgggaagcgggtactgatttcacgctgacctatcatccctcaag cggaggatgtggcagctctactactgttggcagggcacgcatttccgggcacttttgaggag ggaccaaggtcgaaatcaaggaggagggtggctcggcgaggaggctcggaggagg aggatcaggaggcgggtggaagcgagattcaactggtccagagcggcgagaaagcaagaa gccgggtgaatcgctcagaatcctgcaaaaggatcgggattcaatcgaggactactacat tactgggtcagacaaatgccgggcaaagggtggaatggatgggaggatcgacccga aaacgatgaaccaagtacggaccaatctccaaggcacgtgaccttccggcgacacct caatcaacactgtgtacctccagtggagctcacttaaggccagcgataccgccatgtactattg cgcttccgagggggtgtactgggacagggcactactgtgacctgtcatccaccactac cccagcaccgaggccacccacccggctcctaccatcgctccagcctctgtccctgcgtc cggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgcataccggggtcttgactcgcctgc gatatctacatttggggccctctggctggtacttgcgggtcctgctgttctactcgtgatcact cttactgtaagcgggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccttcatgaggcctgt gcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccgttccagaggaggaggaaggcgg ctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgagatgtccagcctacaagcaggggcag aaccagctctacaagaactcaatcttggtcggagagaggagtacacgtgctggacaagcg gagaggacgggaccagaaatggcggggaagccgcgcagaaagaatcccaagagggc ctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagg ggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacca aggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg</p>
<p>CAR7 Completo - aa</p>	<p>- 79</p>	<p>malpvtalllplalllhaarpdvmtqspdslavslgeratinc<u>kssqsllds</u><u>dgktyln</u>wlq qkpgqppkrlis<u>lvskld</u>sgvpdrfsgsgsgtdfilitisslqaedvavyye<u>wqgthfpgtfg</u> ggtkveikgggsgggsgggsgggsgggseiqlvqsgaevkkgpesslrisckgsgfniedy <u>yih</u>wvrqmpgkglewm<u>gridpendetkvgpifqgh</u>hvtisadtsintvylqwsslkasd tamyyca<u>frggvy</u>wgqgtvtvssttpaprpptpaptiasqpplrpeacrpaaggavhtr gldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqtteedgescrfp eeeeggcelrvkfsrsadapaykqqnqlynelnlgrreedyvldkrrrdpemggkpr knpqeglynelqkdkmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalp pr</p>

CAR 8		
dominio scFv de CAR8	80	<p>dvvmtqsplslpvtlgqpasisckssqslldsdgktylnwlqrrpgqsprrlislvsklsgv pdrfsqsgsgtdftlkisrveadvgyycwqgthfpgtfgggkveikgggsgggsg gggsggggseiqlvqsgaevkkgatvkiscksggniedyyihwvqqapgkglewm gridpendetkygpifqgrvtitadtstntvymelsslrsedtavyycafrggywgqgtvt vss</p>
dominio scFv de CAR8 nt	81	<p>gatgtggtcatgacgcagtcaccactgtccctccccgtgaccttgacagccagcgtcgatt agctgcaagtcacccaatccctgctcgattcggatggaaagacctatctcaactggctgcagc aaagacccggtcagagccctaggagactcatctcgttggtgtcaaagctggacagcggagt ccggaccggtttccggttcgggatcggggacggacttactctgaagattcacgggtggaa gctgaggatgtgggagtgtactactgctggcagggaaccatttcctggcacttttggcgga ggaactaaggctgaaatcaaggaggaggtggctcgggaggaggcggatcggcgaggag cgggagcggcgaggagggtccgaaatccaactgtccagtcaggagccgaagtgaagaa accgggagccaccgtcaaatcagctgtaaggatcgggattcaatatcaggactactacat ccactgggtgcagcaagctccgggcaaaggactggagtggatggggcgcatcgaccaga gaacgacgaaaccaatacggcccgatctccaaggcggtgaccatcaccgcggacac ctcaactaacactgtgtacatggagctgagctccctgcgctccgaagatactgcagtctactact gcgccttccgggtggtgtgtactggggacagggcaccactgtgactgtcagctcg</p>

CAR8 - scFv Soluble - nt	82	<p>atggccctccctgtaccgccctgctgcttcgctggctcttctgtccacgccgctcggcccg atgtggtcatgacgcagtcaccactgtccctccccgtgaccttggacagccagcgtcgatta gctgcaagtcateccaatccctgctcgattcggtggaagacctatctcaactggctgcagca aagaccgggtcagagccctaggagactcatctcgttggtgtcaaagctggacagcggagtgc cggaccgggtttccgggttcgggatcggggacggacttcactctgaagatttcacgggtggaag ctgaggatgtgggagtgtactactgtctggcagggaaacccattccctggcacttttggcggag gaactaaggctgaaatcaaggaggaggtggtcgggaggaggcggatcgggcggaggc gggagcggcggaggagggtccgaaatccaactgtccagtcaggagccgaagtgaagaaa ccgggagccaccgtcaaatcagctgtaagggtatcgggattcaatatcaggactactacatc cactgggtgcagcaagctccgggcaaaggactggagtggatggggcgcacgaccagag aacgacgaaaccaatacggcccgatctccaaggcgggtgaccatcacccgcggacacct caactaacactgtgtacatggagctgagctccctgcgctccgaagatactgcagtctactactg cgccttccgggtggtgtgtactggggacagggcaccactgtgactgtcagctcgggggtccc accatcatcaccaccaccatcac</p>
CAR8 - scFv Soluble - aa	83	<p><u>malpvtalllplallhaar</u>pdvmtqsplslpvtlgqpasisckssqsllsdgktylnwlqq rpgqsprrlislvsldsgvpdrfsghsgsgtdftlkisrveadvgyvycwqgthfpgtfggg tkveikgggsgggsgggsgggsgggsciqlvqsgaevkkpgatvkiscksgfniedyyi hwwqqapgkglewmgridpendetkygpifqgrvtitadtstntvymelsslrscdtavy ycafrggvywgqgtvtvssgshhhhhhhh</p>

<p>CAR8 Completo - nt</p>	<p>- 84</p>	<p>atggccctccctgtaccgccctgtgcttccgtggctcttctgtccacgccgctcggcccg atgtggtcatgacgcagtcaccactgtccctccccgtgaccttggacagccagcgctgatta gctgcaagtcacccaatccctgtctgattcggatggaaagacctatctcaactggctgcagca aagaccgggtcagagccctaggagactcatctcgttggtgtcaaagctggacagcggagtgc cggaccgggtttccgggttcgggatcggggacggacttcactctgaagatttcacgggtggaag ctgaggatgtgggagtgtactactgtctggcagggaaacccatttccctggcacttttggcggag gaactaaggctgaaatcaaggaggaggtggctcgggaggaggcgatcgggcggaggc gggagcggcggaggggtccgaaatccaactgtccagtcaggagccgaagtgaagaaa ccgggagccaccgtcaaaatcagctgtaagggatcgggattcaatatcaggactactacatc cactgggtgcagcaagctccggcgaagactggagtggatggggcgatcgaccagag aacgacgaaaccaatacggcccgatctccaagggcgggtgaccatcacccggacacct caactaacactgtgtacatggagctgagctccctgcgctccgaagatactgcagtctactactg cgcttccgcggtggtgtactgggacagggcaccactgtgactgtcagctcgaccactac cccagcaccgaggccaccaccccggtcctaccatcgctcccagcctctgtccctcgctc cggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgcataccggggtcttgacttcgctgc gatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgcttctactcgtgatcact cttactgtaagcgggtcggaagaagctgctgtacatcttaagcaacccctcatgaggcctgt gcagactactcaagaggaggacggctgttcagccggttcccagaggaggaggaaggcgg ctgcgaactgcgctgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcag aaccagctctacaacgaactcaatcttggctcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcg gagaggacgggaccagaaatggcggggaagccgcgagaagaatccccagagggc ctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagg ggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacca aggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg</p>
<p>CAR8 Completo - aa</p>	<p>- 85</p>	<p>malpvtalllplalllhaarpdvmtqsplslpvtlgqpasisc<u>kssqsllds</u><u>dgktyln</u>wlq qrpgqsprrlis<u>lysklds</u>gvpdrrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyyc<u>wqgthfpgt</u>fg ggtkveikgggsgggsgggsgggsgggseiqlvqsgaevkkgpatvkiskcgsgfnied <u>yvih</u>wvqqapgkglewm<u>gridpendetkvgpifqgr</u>vtitadtstntvmelsslrsed tavyycafr<u>rggv</u>wgqgtvtvssttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaaggavhtrg ldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkklyifkqpfmrpvqtqeedgcscrfe eeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreedydldkrrrdpemggkprrk npqeglynelqkdkmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalpp r</p>

CAR 9		Clon 3C10 anti-EGFRvIII de ratón
dominio scFv de CAR9	86	<p>eiqlqqsgaelvkpgasvklsetgsgfiniedyyihwvkqrteqglewigrdpendetkyg pifqgratitadtssntvylqlssltseavvycafrggvywpgtltvssgggsgggsgg gggshmdvmtqspltsvaigqsasiseckssqslldsdgktylnwllqrpqgspkrlislv skldsgvpdrftgsgsgtdflrisrveadlgiyycwqgthfpgtfgggtkleik</p>
dominio scFv de CAR9 nt	98	<p>gagatccagctccaacagagcggagccgaactggtaaacgggagcgtcgggtaagtgt catgcactggatcgggcttaacatcgaggattactacatccactgggtaagcaacgcaccg agcaggggctggaatggatcggacggatcgaccccgaaaacgatgaaaccaagtacgggc ctatctccaagacgggcccaccattacggctgacacgtcaagcaataccgtctacctcagct ttccagcctgacctccgaggacactgccgtgtactactgcgccttcagaggaggcgtgtactg gggaccaggaaccactttgaccgtgtccagcggaggcgggtggatcaggaggaggaggctc aggcgggtggcggctgcacatggacgtggtcatgactcagtcctccgctgacctgtcgggtg caattggacagagcgcacatctctgtgcaagagctcacagtcgctgctggattccgacggaa agacttatctgaactggctgtctccaaagaccagggaatcaccgaaacgccttatctccctgt gtcgaaactcgactcgggtgtgccggatcgggttaccggtagcgggtccggcacggacttca ctctccgcatttcgagggtggaagcggaggatctcgggatctactactgttggcagggaaacc acttcctgggacttttggaggcggaaactaagctggaaatcaag</p>

CAR9 - scFv Soluble - nt	87	<p>atggccctccctgtaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcgcccg agatccagctccaacagagcggagccgaactgggtcaaaccgggagcgtcgggtgaagttgtc atgcactggatcgggcttcaacatcgaggattactacatccactgggtcaagcaacgcaccga gcaggggctggaatggatcggacggatcgaccccgaaaacgatgaaaccaagtacgggcc tatctccaaggacgggccaccattacggctgacacgtcaagcaataccgtctacctcagctt tccagcctgacctccgaggacactgccgtgtactactgcgccttcagaggagcgtgtactgg ggaccaggaaccactttgaccgtgtccagcggagcggtggatcaggaggaggaggtca ggcgggtggcgctcgacatggacgtggtcatgactcagtcctcgctgacctgtcggtggc aattggacagagcgcacatctcgtgcaagagctcacagtcgctgctggattccgacggaaa gacttatctgaactggctgctccaaagaccagggaatcaccgaaacgccttatctccctggtg tcgaaactcgactcgggtgtgccgatcggtttaccggtagcgggtccggcacggacttcact ctccgcatttcgagggtggaagcggaggatctcgggatctactactgttggcagggaaacca cttcctgggacttttgaggcggaactaagctggaatcaagggtagccatcaccatcacca ccaccatcat</p>
CAR9 - scFv Soluble - aa	88	<p><u>malpvtalllplalllhaarpeiq</u>lqqsgaelvkpgasvklscetgsgfniedyyihwvkqrte qglewigrdpendetkygpifqgratitadtssntvylqlssltstavyycfrggvywg pgttltvssggggsgggsgggshmdvmtqsppltlsvaigqsasisckssqllsdgkt ylnwllqrpqspkrlislvskldsgvpdrftgsgsgtdftlrirveaedlgiyycwqgthfp gtfgggtkleikgshhhhhhhh</p>

<p>CAR 9 - 89 Completo - nt</p>	<p>atggccctccctgtaccgccctgctgcttccgctggctcttctgtccacgccgctcgcccg agatccagctccaacagagcggagccgaactggtaaacgggagcgtcggtgaagtgtc atgcactggatcgggttcaacatcgaggattactacatccactgggtcaagcaacgcaccga gcaggggctggaatggatcgacggatcgaccccgaaaacgatgaaaccaagtacgggcc tatcttcaaggacgggccaccattacggctgacacgtcaagcaataacgtctacctccagctt tccagcctgacctccgaggacactgccgtgtactactgcgccttcagaggagcggtgtactgg ggaccaggaaccactttgaccgtgtccagcggaggcggtggatcaggaggaggaggtca ggcgggtggcgctcgacatggacgtggtcatgactcagccccgctgacctgtcggtggc aattggacagagcgcacatctcgtgcaagagctcacagtcgctgctggattccgacggaaa gacttatctgaactggctgtctcaagaccagggaatcaccgaaacgccttatctccctggtg tcgaaactcgactcgggtgtccggatcgggttaccggtagcgggtccggcacggacttact ctccgcatcttcgagggtggaagcggaggtatctcgggatctactactgttggcagggaaacca cttccctgggacttttgaggcggaaactaagctggaatcaagaccactacccagcaccga ggccaccaccccggtctaccatcgctcccagcctctgtccctgcgtccggagcatgta gacccgcagctggtggggccgtgcataccggggtcttgacttcgcctgcgatattacattg ggccctctggtggtacttgcgggtctgctgcttccactcgtgatcactcttactgtaagcg cggtcggagaagctgctgtacatcttaagcaacccttcagaggcctgtgcagactactcaa gaggaggacggctgttcacgtccgggtcccagaggaggaggaaggcggtcgcgaactgcgc gtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctaca acgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacggg accagaaatggcggggaagccgcgagaagaatcccaagaggcgctgtacaacgag ctccaaaaggataagatggcagaagcctatacgagattggtatgaagggaacgcagaa gaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctctcacatgcaggccctgccgcctcgg</p>
<p>CAR 9 - 90 Completo - aa</p>	<p>malpvtalllplallhaarpeiqlqqsgaelvkpgasvklsetgsgfniedvvihwvkqrte qglewigridpendetkygpifqgratitadtssntvylqlsslsedtavyycafrrggvyw gpgttltvssggggsgggsgggshmdvmtqsppltlsvaigqsasisckssqsllds gktvlnwllqrpqspkrlislvskldsgvpdrftgsgsgtdftlrisrveadlgiyycwqgt hfpgtfgggtkleikttpprptpaptiasqplsrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiw aplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgscrfpeeeeggcelrv kfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrrcydvldkrrgdpemggkprknpqeglynel qkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr</p>

CAR10		Clon 139 anti-EGFRvIII
dominio scFv de CAR10	91	<p>diqmtqspsslsasvgrvtrtcrasqgirnlnawyqqkpgkapkrliaasnlsqsgvpsrft</p> <p>gsgsgteftlivsslqpedfatyyclqhhsypltsgggtkveikrtgstsgsgkpgsggegsev</p> <p>qvlesggglvqpggsrlscaasgftfssyamswvrqapgkglewvsaisgsggstnyads</p> <p>vkgrftisrdnskntlylqmnsracdtavyyacgssgwseywgqgtlvtvss</p>
dominio scFv de CAR9 nt	92	<p>gatatccaaatgactcagagcccttcacccctgagcgccagcgctcgagacagggtgacat</p> <p>cacgtgccggcatcccaaggcattagaaataactggcgtggtatcagaaaaaccaggaa</p> <p>aggccccgaagcgctgatctacggcctccaaccttcagtcaggagtgcctcgcgcttc</p> <p>accgggagcggtagcggaactgagttacccttatcgtgctcctgcagccagaggacttc</p> <p>gcgacctactactgctccagcatcactcgtaccggtgacttcgggaggcggaaccaaggtc</p> <p>gaaatcaaacgcactggctcgacgtcagggtccggtaaaccgggatcgggagaaggatcg</p> <p>gaagtccaagtgtggagagcggaggcggactcgtcaacctggcgggtcgtgcggctc</p> <p>agctgtccgcgtcgggtttactttcagctcgtacgctatgtcatgggtgcggcaggctccgg</p> <p>gaaaggggctggaatgggtgtccgctatttcggctcgggtggaagcacaattacgccgac</p> <p>tccgtgaaggagcgttcaccatctcacgggataactccaagaatactctgtacctccagatga</p> <p>actcgtgagagccgaggacaccgcagtgactactgcgcagggtcaagcggctgtccga</p> <p>atactggggacagggcaccctcgtcactgtcagctcc</p>
CAR10 - scFv Soluble - nt	93	<p>atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg</p> <p>atatccaaatgactcagagcccttcacccctgagcgccagcgctcgagacagggtgacatc</p> <p>acgtgccgggcatcccaaggcattagaaataactggcgtggtatcagaaaaaccaggaaa</p> <p>ggccccgaagcgctgatctacggcctccaaccttcagtcaggagtgcctcgcgcttca</p> <p>ccgggagcggtagcggaactgagttacccttatcgtgctcctgcagccagaggacttcg</p> <p>cgacctactactgctccagcatcactcgtaccggtgacttcgggaggcggaaccaaggtcg</p> <p>aaatcaaacgcactggctcgacgtcagggtccggtaaaccgggatcgggagaaggatcgga</p> <p>agtccaagtgtggagagcggaggcggactcgtcaacctggcgggtcgtgcggctcag</p> <p>ctgtgccgcgtcgggtttactttcagctcgtacgctatgtcatgggtgcggcaggctccggga</p> <p>aaggggctggaatgggtgtccgctatttcggctcgggtggaagcacaattacgccgactc</p> <p>cgtgaaggagcgttcaccatctcacgggataactccaagaatactctgtacctccagatgaa</p> <p>ctcgtgagagccgaggacaccgcagtgactactgcgcagggtcaagcggctgtccgaa</p> <p>tactggggacagggcaccctcgtcactgtcagctcccatcaccatcaccaccacatcac</p>

CAR10 - scFv Soluble - aa	94	<p><u>malpvtalllplalllhaarpdiqmtqspsslsasvgrvtitcrasqgirnlnlawyqqkpgk</u></p> <p>apkrliyaasnlqsgvpsrftgsgsgteflivsslqpedfatyyclqhhsypltsgggkveik</p> <p>rtgstsgsgkpgsggegseqvlesggglvqpggslrlscaasgftfssyamswvrqapkgk</p> <p>lewvsaisgsggstnyadsvkgrftisrdsnkntlylqmnsraedtavvycagssgwsey</p> <p>wgqgtlvtvss<u>hhhhhhhh</u></p>
CAR 10 Completo - nt	95	<p>atggccctccctgtcaccgccctgctgctccgctggctcttctgctccacgccgctcgggccg</p> <p>atatccaatgactcagagcccttcacccctgagcgccagcgctcgagacagggtgaccatc</p> <p>acgtgccgggcatcccaaggcattagaataacttggcgtggtatcagcaaaaccaggaaa</p> <p>ggccccgaagcgctgactacggcgccccaaccttcagtcaggagtgcctcgcgcttca</p> <p>ccgggagcggtagcgggaactgagttacccttatcgtgctgctccctgcagccagaggacttcg</p> <p>cgacctactactgcctccagcatcactcgtaaccgttgacttcgggaggcggaaccaaggtcg</p> <p>aaatcaaacgcactggctcgacgtcagggtccggtaaacgggagcgggagaaggatcgga</p> <p>agtccaagtgtgagagcggagggcgactcgtgcaacctggcggtcgctcgcgctcag</p> <p>ctgtgccgctcgggttttactttcagctcgtacgtatgcatgggtcgggcaggctccggga</p> <p>aaggggctggaatgggtgtccgctatttccggctcgggtggaagcaccaattacgccgactc</p> <p>cgtgaagggacgcttcaccatctcacgggataactccaagaatactctgtacctccagatgaa</p> <p>ctcgtgagagccgaggacaccgcagtgtactactgcgcagggtcaagcggtggtccgaa</p> <p>tactggggacagggcacctcgtcactgtcagctccaccactacccagaccaggccac</p> <p>ccaccccggtcctaccatcgctccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccg</p> <p>cagctggtggggccgtgcataccggggtcttgacttcgctgcgatatctacattgggccc</p> <p>tctggctggtacttgcgggtcctgctgcttctactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcg</p> <p>gaagaagctgctgtacatctttaagcaaccttcagggcctgtgcagactactcaagagga</p> <p>ggacggctgtcatgccggtcccagaggagggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaa</p> <p>attcagccgcagcgcagatgtccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaa</p> <p>ctcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacca</p> <p>gaaatgggcggaagccgcgagaagaatcccaagagggcctgtacaacgagctccaa</p> <p>aaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagggaacgcagaagaggc</p> <p>aaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacatgtacgctc</p> <p>ttcacatgcaggccctgccgctcgg</p>
CAR 10 Completo - aa	96	

		malpvtalllplalllhaarpdqmtqspsslsasvdrvitterasqgirnlnlawyqqkpgk apkrliyaasnlgsgvpsrftgsgsgteftlivsslqpedfatyyclqhhsypltsgggkveik rtgstsgsgkpgsggegsevgvlesggglvqpggslrslcaasgftssyamswvrqapgk lewwsaisgsggstnyadsvkgrftisrdnsntlylqmnsraedtavvycagssgwsey wgqgtltvsttppaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwapla gtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcsrfpeeeeggcelrvkfsrs adapaykqgqnqlynelnlgrreedyldkrrgrdpemggkprknpqeglynclqkdk maeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr
--	--	---

Los fragmentos de scFv de CAR se clonaron luego en vectores lentivirales para crear una construcción de CAR de longitud completa en un único marco de codificación, y utilizando el promotor EF1 alfa para la expresión (SEQ ID NO: 97).

5

Promotor EF1 alfa

10

GTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAG
AAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGG
TAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGA
GAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGC

15

CGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGG
GTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTG
ATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGG
AGCCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCG
TGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTTCGATAAGTCTCTAGCCA

20

25

TTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTA
ATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGAC
GGGGCCCGTGCGTCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGC
CACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGC
CTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTTCGGCACC

30

35

AGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAA
TGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAAGTACCCACACAAAGGAAA
AGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGTTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCC
GTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGG
GGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTA
GGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGGAATTTGCCCTTTTGAAGTTGGAT
CTTGTTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTACGG

40

45

TGTCGTGA (SEQ ID NO: 97).

Expresión en superficie de CAR9, CAR10 y construcciones CAR EGFRvIII humanizadas y tinción seleccionada por FACS

50

Los siguientes experimentos demostraron que parece haber una diferencia de afinidad para los estudios de unión in vitro basados en EGFRvIII tanto en células Jurkat como en células T primarias.

Células Jurkat E6 se electroporaron con el vector CAR9 o el vector CAR10 utilizando el kit V Amaxa Cell Line Nucleofector (Lonza, Colgne AG, Alemania) y el programa X-001. Un día después de la transfección, 0.5×10^6 células se colocaron en cada uno de los pocillos de una placa en forma de V de 96 pocillos (Greiner Bio-One, Alemania) en 0,2 ml de tampón FACS (tampón DPBS que contiene FBS al 5%) y se incubaron durante 10 minutos a la temperatura ambiente. Las células luego se centrifugaron y se resuspendieron en 0,2 ml del tampón FACS con diferentes concentraciones de EGFRvIII-Fc o EGFRwt-Fc y se incubaron a 4°C durante 30 minutos. Las células se lavaron luego con tampón FACS tres veces y se incubaron con 0,2 ml del tampón FACS con 2 µl de IgG PE Fc anti-humana (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) durante 30 minutos a 4°C en la oscuridad. Después de lavar tres veces con 0,2 ml de tampón FACS, las células se analizaron en una máquina LSRII (BD Biosciences, San Jose, CA) utilizando el software FACSDiva (BD Biosciences, San Jose, CA). La tinción de inmunofluorescencia se analizó como el log relativo de fluorescencia de las células vivas, y se midió el porcentaje de células positivas para PE.

Como se muestra en la Figura 12, la unión del CAR9 expresado en células Jurkat a la proteína de fusión EGFRvIII-Fc es aproximadamente 1000 veces más fuerte que al EGFR-Fc de tipo salvaje. Además, la construcción CART que expresa CAR10 exhibe una unión significativamente menor (~ 40 veces) a EGFRvIII en comparación con CAR9. Esto sugiere que, aunque el CAR9 murino se une a EGFRvIII, aún conserva cierta unión al EGFR de tipo salvaje. Además, indica fuertemente que CAR9 tiene una mayor afinidad de unión por EGFRvIII que la construcción CAR10.

Experimentos adicionales en células T primarias proporcionaron resultados similares. En síntesis, las células T CD3+ humanas primarias se estimularon con microesferas anti-CD3/CD28 durante 24 h y luego se transdujeron con vectores lentivirales que codifican CAR9, CAR10, CAR6 o un CAR de control con una MOI (siglas inglesas de multiplicidad de infección) de 3:1. También se incluyó en el experimento una población de células T transducidas de modo simulado. Estas células se expandieron durante aproximadamente 8-9 días en cultivo hasta que comenzaron a descansar. En este punto, se colocaron 0.5×10^6 células en cada uno de los pocillos de una placa en forma de V de 96 pocillos. Las células se lavaron una vez con PBS y se tiñeron con reactivo Live/Dead (1:1000 en PBS) durante 30 min en hielo. Las células se lavaron luego dos veces con tampón FACS y se incubaron con 1 µg/ml de proteína EGFRvIII o EGFR wt biotinilada durante 30 min en hielo. Luego, las células se lavaron dos veces y se incubaron con 0,2 ml de tampón FACS con una dilución 1:1000 de estreptavidina-PE durante 15 min en hielo. Después de lavar dos veces con tampón FACS, las células se analizaron en un LSRII.

La tinción de inmunofluorescencia se analizó como el log relativo de fluorescencia de células vivas, y se midió el porcentaje de células PE-positivas en unión con la media geométrica de la población positiva.

Como se muestra en la Figura 13, los CARs CAR9 y CAR6 muestran una media geométrica 10 veces mayor (21K para CAR9, 27K para CAR6) para la unión de EGFRvIII que el CAR10 (solo 2K) cuando se utilizan cantidades saturantes de proteína EGFRvIII para detección, incluso a pesar de que todas las construcciones transducen de manera equivalente (~ 50% de eficiencia de transducción para todos). De manera similar, la especificidad para la proteína EGFR wt es aproximadamente 10 veces menor, tal como se muestra por el desplazamiento log hacia abajo para la tinción con la proteína EGFR wt. Esto proporciona apoyo adicional a los hallazgos en las células Jurkat anteriores que indican que CAR9 y CAR6 tienen una afinidad más fuerte por la proteína EGFRvIII en comparación con CAR 10 cuando se expresan en células T primarias y sugieren que serán más eficaces en la clínica.

El análisis funcional del panel de construcciones CAR humanizadas se realizó como se describe en el Ejemplo 8.

Ejemplo 8: Análisis de Construcciones CAR específicas para EGFRvIII humanizadas en células T

Para evaluar la viabilidad de fijar como objetivo EGFRvIII a través de una tecnología CAR, los fragmentos de scFv EGFRvIII humanizados se clonaron en un vector de expresión CAR lentiviral con la cadena CD3zeta y la molécula co-estimulante 4-1BB en dos configuraciones diferentes. La construcción óptima se selecciona en base a la cantidad y calidad de la respuesta de las células T efectoras de células T transducidas con CAR EGFRvIII en respuesta a las dianas EGFRvIII+ y EGFR wt. Las respuestas de células T efectoras incluyen, pero no se limitan a expansión celular, proliferación, duplicación, producción de citoquinas y destrucción de células diana o actividad citolítica (desgranulación).

Materiales y Métodos

Generación de línea celular informadora Jurkat para caracterización inicial de la función CAR

Como alternativa a la transducción y activación de células T primarias, se puede utilizar una línea celular informadora Jurkat-NFAT para evaluar la actividad funcional de las construcciones CAR. La línea de células T Jurkat (E6-1) se transfectó con una construcción informadora de NFAT-luciferasa y se seleccionó una línea celular clonal estable (JNL) para una caracterización adicional basada en la inducción fuerte del informador NFAT después de la estimulación con PMA e ionomicina. Las células JNL se transducen con vectores lentivirales a una MOI de 5:1 y luego se expanden durante 5-7 días. Antes de utilizar en un ensayo, el porcentaje de células transducidas (que expresan el CAR EGFRvIII en la superficie celular) y su intensidad de fluorescencia relativa de esa expresión se determinan mediante análisis de citometría

de flujo en un LSRII. De las gráficas del histograma, se pueden examinar los niveles de expresión relativa de los CARs comparando el porcentaje transducido con su intensidad fluorescente relativa.

Evaluación de la activación de células T de células CAR JNL específicas para EGFRvIII humanizadas

Para evaluar la activación de las células T en la línea celular informadora JNL, células JNL o JNL transducidas con CAR se sembraron en placa a razón de 50.000 células por pocillo en una placa negra de 96 pocillos con un fondo transparente. Las células diana (células parentales BHK o células BHK diseñadas para expresar EGFRvIII o EGFR wt) se añaden a los pocillos para crear relaciones efector a diana (E:T) de 1:2, 1:1, 1:0,3, 1:0,1, 1:0,03, 1:0,1 y 1:0,003. PMA e ionomicina se utilizan como control positivo para la activación. Las células se incuban a 37°C durante 16-24 h. Al final de la incubación, se añade un volumen igual de reactivo de ensayo Bright-Glo Luciferasa a cada uno de los pocillos. La placa se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego se mide la luminiscencia utilizando un luminómetro.

Generación de células CAR T específicas para EGFRvIII humanizadas redirigidas

Los vectores de transferencia lentivirales CAR específicos para EGFRvIII humanizados se utilizan para producir el material genómico empaquetado en las partículas lentivirales pseudotipadas VSVg.

El ADN del vector de transferencia lentiviral se mezcla con los tres componentes de empaquetamiento de VSVg, gag/pol y rev en combinación con el reactivo de lipofectamina para transfectarlos juntos en células 293T. Después de 24 y 48 h, los medios se recogen, se filtran y se concentran por ultracentrifugación o cromatografía. La preparación viral resultante se almacena a -80°C. El número de unidades de transducción se determina mediante titulación en células SupT1.

Las células CART específicas para EGFRvIII redirigidas se producen mediante la activación de células T recientes mediante el acoplamiento con perlas CD3x28 durante 24 h y luego añadiendo el número apropiado de unidades de transducción para obtener el porcentaje deseado de células T transducidas. Estas células T modificadas pueden expandirse hasta que descansen y bajen de tamaño (~ 300 fl) en ese momento se crioconservan para su posterior análisis. Los números y tamaños de células se miden utilizando un aparato multisizer III de Coulter. Antes de la crioconservación, el porcentaje de células transducidas (que expresan el CAR específico para EGFRvIII en la superficie celular) y su intensidad de fluorescencia relativa de esa expresión se determinan mediante análisis de citometría de flujo en un LSRII. De las gráficas del histograma, se pueden examinar los niveles de expresión relativa de los CARs comparando el porcentaje transducido con su intensidad fluorescente relativa.

Evaluación de la actividad citolítica, las capacidades de proliferación y la secreción de citoquinas de las células T CAR redirigidas a EGFRvIII humanizadas.

Para evaluar las capacidades funcionales de las células CAR T específicas para EGFRvIII humanizadas para matar, proliferar y secretar citoquinas, las células se descongelan y se les permite recuperarse durante la noche. Además de las construcciones humanizadas, el CAR9 murino se utilizó con fines comparativos, mientras que SS1-BBz se utilizó como CAR expresado sin fijación de objetivo para el efecto de células CAR/T de fondo. Para este ensayo de citotoxicidad basado en el flujo, las células diana se tiñen con CFSE para cuantificar su presencia. Las células diana también se tiñeron para la expresión de EGFRvIII para confirmar niveles de antígenos diana similares. Las actividades citolíticas de las células CAR T EGFRvIII se miden a una titulación de las relaciones de efectores:células diana de 10:1, 3:1, 1:1, 0,3:1 y 0:1, en que los efectores se definieron como células T que expresan el CAR anti-EGFRvIII. Los ensayos se iniciaron mezclando un número apropiado de células T con un número constante de células diana. Después de 4 o 16 h, se eliminó el volumen total de cada una de las mezclas y se lavó cada uno de los pocillos. Las células T se tiñeron para CD3 y todas las células se tiñeron con marcador live/dead 7AAD. Después del lavado final, las células granuladas se resuspendieron en un volumen específico con un número predeterminado de perlas de conteo. Los datos de tinción celular se recogieron mediante citometría de flujo LSRII y se analizaron con el software FlowJo utilizando perlas para cuantificar los resultados.

Para medir la proliferación celular y la producción de citoquinas de células T CAR-EGFRvIII humanizadas, las células se descongelaron y se les permitió recuperarse durante la noche. Además del CAR-EGFRvIII humanizado, el CAR9 murino se utilizó con fines comparativos, mientras que el SS1-BBz se utilizó como un CAR expresado sin fijación de objetivo para el efecto de células CAR/T de fondo. Las células T se dirigieron hacia U87, una línea celular de glioblastoma derivada de astrocitoma que expresa o no EGFRvIII. Además, se utilizaron perlas CD3x28 para evaluar el potencial de células T para responder a la segunda ronda de señales inmunológicas endógenas. Para analizar la proliferación, las células T se tiñeron con CFSE. La proliferación fue la dilución de la mancha de CFSE que refleja la separación de las marcas parentales ahora en dos células hijas. El ensayo testó solo una relación efector:diana de 1:1 y 1:0, en donde los efectores se definieron como células T totales (CD4 y 8) normalizadas para expresar el receptor quimérico anti-EGFRvIII en un porcentaje común. El ensayo se realizó por duplicado y 24 h después de mezclar las células. El sobrenadante se separó para la producción de citoquinas. Después de 5 días, las células T se tiñeron para vivas/muertas con Live/Dead Violet (Invitrogen), luego se tiñeron para la expresión de CAR y se fenotiparon como células CD4 o CD8. Después del lavado final, las células granuladas se resuspendieron en un volumen específico con un número predeterminado de perlas de recuento BD. Los datos de tinción celular se recogieron mediante citometría de flujo LSRII y se analizaron con el software FlowJo utilizando

perlas para cuantificar los resultados. Los recuentos de células totales se determinaron mediante un cierto número de células contadas con relación a un número específico de perlas, multiplicado por la fracción de perlas aún por contar.

Resultados

Ensayo de informador Jurkat para testar la capacidad de las células CART-EGFRvIII humanizadas para reconocer células diana EGFRvIII.

La capacidad de las construcciones CART para inducir la activación después del acoplamiento diana se midió con la línea celular informadora JNL. La línea celular JNL está diseñada con una construcción informadora NFAT-Luciferase que se induce después del acoplamiento diana del CAR. Las células JNL se transdujeron con las diversas construcciones CAR-EGFRvIII (CAR9, CAR3, CAR6, CAR8 y CAR 10). La eficacia de la transducción se evaluó mediante citometría de flujo y se demostró que era de aproximadamente 45-52% para todas las construcciones. Las células JNL-CAR-EGFRvIII se estimularon luego con siete relaciones E:T diferentes utilizando tres células diana diferentes (BHK parental, BHK-EGFRvIII o BHK-EGFR wt). Las células parentales JNL y las células JNL que expresan un control CAR se incluyeron como controles adicionales. Los resultados en la Figura 14 demuestran que puede producirse una activación significativa inducida por una diana en relaciones tan bajas como 1: 0,01 para todas las construcciones testadas y CAR6 y CAR10 inducen la mayor activación en las relaciones E: T. No se observó activación significativa con las células que expresan EGFR wt o con las células JNL que expresan CAR de control. Estos datos demuestran la especificidad de las construcciones CAR para la diana EGFRvIII y la falta de reactividad cruzada a la diana EGFR wt.

Transducción y expansión de células T humanas primarias con las construcciones CAR EGFRvIII humanizadas

Se obtuvieron células T CD3+ a partir de productos de aféresis o sangre entera de donantes sanos. Como se describió anteriormente, las células T se estimularon con perlas CD3xCD28 durante 24 h y luego se transdujeron con sobrenadantes lentivirales concentrados a una MOI de 3. Las células se expandieron en cultivo durante 8-10 días.

Las expresiones de la superficie celular de CARs EGFRvIII humanizados son equiparables y su nivel de expresión es muy similar al CAR9 murino. La superposición de histogramas que representan el patrón de tinción de la expresión de la superficie celular de cada una de las células T transducidas con CAR específica para EGFRvIII humanizado y la intensidad fluorescente media (MFI) calculada a partir de estos perfiles se correlaciona bien con el porcentaje de células transducidas.

Ensayo de proliferación para testar la capacidad de las células diana EGFRvIII para estimular las células CART EGFRvIII humanizado

La capacidad de las células CAR T específicas para EGFRvIII de proliferar en respuesta al acoplamiento diana se evaluó en un ensayo de proliferación. Las subpoblaciones se enumeraron por citometría de flujo. Las células T donantes se transdujeron con CARs humanizados, CAR9 murino o SS1 (fijación como objetivo de mesotelina). Los CARs se mezclaron 1:1 o 1:0 con células diana y se cultivaron conjuntamente durante 5 días. La Figura 15 muestra la capacidad de las células T CAR EGFRvIII ND407 de proliferar de una manera específica para el antígeno. La barra de trazos indica el número de células T sembradas y, comparativamente, no se detectó un aumento en los números de células T que fijan como objetivo U87, mientras que el acoplamiento con la proliferación inducida por U87-EGFRvIII era específica para las poblaciones de células T CAR EGFRvIII. La respuesta relativa para ND407 indicó que CAR6 y CAR8 son más robustos que CAR9 o CAR3. El resultado de perlas de CD3x28 indica que su estimulación no era suficiente para impulsar la proliferación en una segunda ronda de activación, similar a ninguna estimulación en absoluto.

Células T ND407 se utilizaron para rastrear diferentes CARs huEGFRvIII en cuanto a su capacidad de expandir preferentemente las células T CAR+. La Figura 16 muestra que CAR5 y CAR6 tienen consistentemente la mayor expansión de CAR+ en cada uno de los donantes. El incremento de CAR+ es el resultado de un acoplamiento con éxito con la diana, la proliferación y la supervivencia de la activación inducida por la muerte celular del reconocimiento de antígeno.

Ensayo de exterminio para testar la capacidad de las células CART EGFRvIII humanizadas para matar células que fijan como objetivo EGFRvIII

La capacidad de las células T CAR específicas para EGFRvIII de matar dianas se testó en un ensayo de liberación de cromo. La línea celular de glioblastoma humano, U-87MG, se diseñó para expresar el receptor de tipo salvaje EGFR o el mutante EGFRvIII. Estas líneas celulares diseñadas sirvieron como dianas para el ensayo de exterminio. Se utilizaron tres células T CAR efectoras para determinar la especificidad de matar células diana; 1) células T humanas transducidas para expresar 3C10 murino (CAR9), 2) células T humanas transducidas para expresar una versión humanizada del 3C10 murino, al que se alude como CAR6 y 3) células T humanas transducidas con un CAR específico para mesotelina, SS1.

Todas las células efectoras se normalizaron para expresar 30% de transducción de CAR+. Las células diana se marcaron con cromo-51 y se lavaron inmediatamente antes del co-cultivo. Los efectores y las dianas se mezclaron en las relaciones indicadas (E:T) y se dejaron incubar durante 4 horas.

Los resultados en la Figura 17(A) demuestran que las células CAR T mezcladas con células U-87 que expresan el receptor EGFR de tipo salvaje no mostraron muerte celular por encima del fondo hasta una E:T de 50:1. Sin embargo, los resultados en la Figura 17(B) demuestran que, en contraste, las células CAR T específicas para EGFRvIII, CAR9 o CAR6, mezcladas con células U-87 que expresan EGFRvIII, mostraron una muerte específica a relaciones E:T de 6,25:1 hasta 50:1. No se observó ninguna muerte significativa cuando las células T CAR específicas para mesotelina se utilizaron como efectores. Estos datos demuestran el exterminio dirigido específico de las células diana que expresan EGFRvIII por las células T CAR9 y CAR6, pero no el exterminio de las células que expresan EGFR de tipo salvaje o por una célula CAR T no específica, SS1.

Ensayo de citoquinas para testar la capacidad de las células CART EGFRvIII humanizadas para fomentar una respuesta antitumoral y demostrar especificidad

La capacidad de las células CAR T específicas para EGFRvIII de inducir citoquinas en respuesta al acoplamiento diana se evaluó en un ensayo de co-cultivo. Las células T CAR se cultivaron conjuntamente con células que expresan la diana durante 18-24 h a diversas relaciones diana:efector (0,3:1, 1:1, 3:1 y 10:1). Las células diana incluían células U87 que expresaban la proteína endógena EGFR wt (U87 wt), células U87 que sobre-expresan EGFRvIII (U87-vIII), células parentales BHK (células de riñón de hámster bebé), células BHK que sobre-expresan proteína EGFR wt humana (BHK wt) o células BHK que sobre-expresan la proteína EGFRvIII humana (BHK-vIII). Después de 18-24 h, se retiraron los sobrenadantes de los cultivos y se analizaron las citoquinas utilizando un Ensayo de Perlas Citométricas (CBA, por sus siglas en inglés). Los resultados demostraron claramente que 1) las células T CAR6 y CAR9 indujeron niveles similares de IFN γ en respuesta a las células que expresan EGFRvIII y 2) que ninguna población de células T CAR indujo IFN γ en respuesta a las células que expresan EGFR wt. Es importante destacar que estos datos, junto con los datos de exterminio y proliferación indican que CAR6 y CAR9 muestran especificidad funcional para EGFRvIII y tienen la capacidad de fomentar una respuesta inmune antitumoral.

Ejemplo 9: Células T CAR anti-EGFRvIII humanizadas reducen la carga tumoral en ratones

Se demostró que las células T CAR anti-EGFRvIII humanizadas reducen la carga tumoral in vivo en ratones. Por ejemplo, los linfocitos T humanos transducidos lentiviralmente del receptor de antígeno quimérico (CAR) anti-EGFRvIII humanizado (CAR6) n° 2173 se suministraron por vía intravenosa a ratones NOD/SCID/cadena gamma común/-inmunocomprometidos xenogénicos tratados establecieron tumores de glioma U87vIII in vivo. Los ratones de control con tumores subcutáneos en el flanco U87vIII establecidos en 5 días que recibieron tumores de células T transducidas no compatibles no-CAR con donantes crecieron rápidamente, tanto por medición directa del tumor subcutáneo utilizando calibradores (longitud máxima x anchura máxima) como por emisión de fotones medida por el sistema de formación de imágenes Spectrum in vivo (IVIS). En ratones tratados que reciben incluso números bajos ($0,5 \times 10^6$) de células transducidas con CAR6, el crecimiento del tumor se redujo notablemente en ratones de una manera dependiente de la dosis.

En este ejemplo, 1×10^6 gliomas humanos U87vIII que expresa EGFRvIII, GFP+ Luc+ se lavaron y se inyectaron por vía subcutánea en 100 μ L de solución salina en los flancos de 30 ratones inmunocomprometidos con NSG (N = 10/grupo). Las células T humanas se estimularon con perlas recubiertas con anti-CD3/28 y se transdujeron lentiviralmente con scFv CAR EGFRvIII n° 2173 (CAR6) humanizado. Después de la transducción, la expansión ex vivo y la eliminación de perlas, las células T transducidas con CAR (~ 50% de CAR+ por citometría de flujo) se lavaron e inyectaron en 100 μ L de solución salina a través de la vena de la cola 5 días después de la implantación del tumor. El crecimiento del tumor se evaluó mediante la medición del calibre (arriba a la izquierda) y la emisión de fotones inducida por luciferina (arriba a la derecha). Las mediciones se iniciaron 7 días después de la transferencia de células T y 12 días después de la inyección del tumor. El SEM se muestra en la Figura 18 (N = 10 ratones/grupo). La supervivencia de cada uno de los grupos se representa mediante las curvas de Kaplan Meier en la Figura 18 (inferior). Todos los ratones que recibieron células T de control murieron el día 26, teniendo el grupo que recibió $0,5 \times 10^6$ y $1,0 \times 10^6$ células T CAR6 una supervivencia del 30% y 90%, respectivamente a partir del día experimental 30.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> NOVARTIS AG
 TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA
 UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION
 <120> TRATAMIENTO DEL CÁNCER UTILIZANDO RECEPTOR DE ANTÍGENO QUIMÉRICO ANTI-EGFRVIII
 HUMANIZADO
 <130> N2067-7000WO
 <140>
 <141>
 <150> 61/888,255
 <151> 2013-10-08
 <150> 61/767,071
 <151> 2013-02-20
 <160> 127
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 535
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 1

Met	Ala	Leu	Pro	Val	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu	1	5	10	15
His	Ala	Ala	Arg	Pro	Gly	Ser	Glu	Ile	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	20	25	30	
Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Thr	Gly	Ser	35	40	45	
Gly	Phe	Asn	Ile	Glu	Asp	Tyr	Tyr	Ile	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Thr	50	55	60	
Glu	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Glu	Asn	Asp	Glu	65	70	75	80
Thr	Lys	Tyr	Gly	Pro	Ile	Phe	Gln	Gly	Arg	Ala	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	85	90	95	
Thr	Ser	Ser	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	100	105	110	

ES 2 760 023 T3

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

ES 2 760 023 T3

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

Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val
385 390 395 400

Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu
405 410 415

Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp
420 425 430

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

Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg
450 455 460

Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly
465 470 475 480

Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu
485 490 495

Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu
500 505 510

Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His
515 520 525

Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
530 535

<210> 2

<211> 491

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 2

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

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

ES 2 760 023 T3

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

ES 2 760 023 T3

275	280	285
Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His		
290	295	300
Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu		
305	310	315
Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr		
325	330	335
Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe		
340	345	350
Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg		
355	360	365
Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser		
370	375	380
Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr		
385	390	395
Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys		
405	410	415
Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn		
420	425	430
Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu		
435	440	445
Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly		
450	455	460
His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr		
465	470	475
Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
485	490	

<210> 3

<211> 488

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 3

ES 2 760 023 T3

Met	Ala	Leu	Pro	Val	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu	1	5	10	15
His	Ala	Ala	Arg	Pro	Gly	Ser	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	20	25	30	
Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	35	40	45	
Ser	Gln	Gly	Ile	Arg	Asn	Asn	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	50	55	60	
Lys	Ala	Pro	Lys	Arg	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Asn	Leu	Gln	Ser	Gly	65	70	75	80
Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	85	90	95	
Ile	Val	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	100	105	110	
Gln	His	His	Ser	Tyr	Pro	Leu	Thr	Ser	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	115	120	125	
Ile	Lys	Arg	Thr	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Pro	Gly	Ser	Gly	130	135	140	
Glu	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Val	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	145	150	155	160
Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	165	170	175	
Ser	Ser	Tyr	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	180	185	190	
Glu	Trp	Val	Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Ala	195	200	205	
Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	210	215	220	
Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	225	230	235	240

ES 2 760 023 T3

Tyr Tyr Cys Ala Gly Ser Ser Gly Trp Ser Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
 245 250 255
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg
 260 265 270
 Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg
 275 280 285
 Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly
 290 295 300
 Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr
 305 310 315 320
 Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg
 325 330 335
 Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro
 340 345 350
 Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu
 355 360 365
 Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala
 370 375 380
 Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu
 385 390 395 400
 Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly
 405 410 415
 Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu
 420 425 430
 Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser
 435 440 445
 Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
 450 455 460
 Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu
 465 470 475 480
 His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485

<210> 4
 <211> 729
 <212> ADN
 <213> Mus sp.
 <400> 4

gagattcagc tgcagcaatc tggggcagaa cttgtgaagc caggggcctc agtcaagctg	60
tcctgcacag gttctggctt caacattgaa gactactata ttcactgggt gaagcagagg	120
actgaacagg gcctggaatg gattggaagg attgatcctg agaatgatga aactaaatat	180
ggcccaatat tccagggcag ggccactata acagcagaca catcctccaa cacagtctac	240
ctgcaactca gcagcctgac atctgaggac actgccgtct attactgtgc ctttcgcggt	300
ggagtctact gggggccagg aaccactctc acagtctcct caggagggtg tggttccggt	360
ggtggtggtt ccggagggtg tggttcacat atggatgttg tgatgacca gtctccactc	420
actctatcgg ttgccattgg acaatcagcc tccatctctt gcaagtcaag tcagagcctc	480
ttagatagtg atggaaagac atatttgaat tgggtgttac agaggccagg ccagtctcca	540
aagcgcctaa tctctctggt gtctaaactg gactctggag tccctgacag gttcactggc	600
agtggatcag ggacagatth cacactgaga atcagcagag tggaggctga ggatttggga	660
atttattatt gctggcaagg tacacatttt cctgggacgt tcggtggagg gaccaagctg	720
gagataaaa	729

<210> 5

<211> 720

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 5

gacatccaga tgaccagag ccctagcagc ctgagcgcca gcgtgggcca cagagtgacc	60
atcacctgtc gggccagcca gggcatcaga aacaacctgg cctggtatca gcagaagccc	120
ggcaaggccc ccaagagact gatctacgct gccagcaatc tgcagagcgg cgtgccccagc	180
agattcaccg gaagcggctc cggcaccgag ttcaccctga tcgtgtccag cctgcagccc	240
gaggacttcg ccacactacta ctgcctgcag caccacagct accctctgac cagcggcgga	300
ggcaccaagg tggagatcaa gcggaccggc agcaccagcg gcagcggcaa gcctggcagc	360
ggcgagggaa gcgaggtcca ggtgctggaa tctggcgggc gactggtgca gcctggcggc	420
agcctgagac tgagctgtgc cgccagcggc ttcacctca gcagctacgc catgtcttgg	480
gtccggcagg ctcttgga aa gggcctggaa tgggtgtccg ccatcagcgg ctctggcggc	540
tccaccaact acgccgacag cgtgaagggc cggttcacca tcagccggga caacagcaag	600
aacaccctgt atctgcagat gaacagcctg agagccgagg acaccgccgt gtactactgt	660
gccggcagca gcgggtggag cgagtactgg ggccagggca cactggtcac agtgtctagc	720

<210> 6

<211> 63

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 6

ES 2 760 023 T3

atggccttac cagtgaccgc ctgtctcttg ccgctggcct tgctgctcca cgcgccagg 60

ccg 63

<210> 7
 <211> 135
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"
 <400> 7

accacgacgc cagcgccgcg accaccaaca ccggcgccca ccatcgcgtc gcagcccctg 60

tccctgcgcc cagagcgctg ccggccagcg gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg 120

gacttcgcct gtgat 135

<210> 8
 <211> 72
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"
 <400> 8

atctacatct gggcgccctt ggccgggact tgtgggggtcc ttctcctgtc actggttacc 60

accctttact gc 72

<210> 9
 <211> 126
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"
 <400> 9

aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacaac catttatgag accagtacaa 60

actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt 120

gaactg 126

<210> 10
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"
 <400> 10

ES 2 760 023 T3

```

agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtaca 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 aggggcacga tggcctttac cagggctctca gtacagccac caaggacacc      300
tacgacgccc ttcacatgca ggcctgccc cctcgc      336

```

<210> 11
 <211> 243
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 <400> 11

```

Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1           5           10           15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Gly Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp Tyr
          20           25           30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Thr Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
          35           40           45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys Tyr Gly Pro Ile Phe
          50           55           60

Gln Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr
65           70           75           80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

```

ES 2 760 023 T3

85

90

95

Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Pro Gly Thr Thr Leu Thr Val
100 105 110

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser His Met Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Thr Leu Ser Val
130 135 140

Ala Ile Gly Gln Ser Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
145 150 155 160

Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro
165 170 175

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

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
195 200 205

Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys
210 215 220

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
225 230 235 240

Glu Ile Lys

<210> 12

<211> 240

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Thr Gly
50 55 60

ES 2 760 023 T3

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Ile Val Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His His Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Gly Ser Thr
100 105 110

Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Glu Val Gln Val
115 120 125

Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
130 135 140

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp
145 150 155 160

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser
165 170 175

Gly Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
180 185 190

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
195 200 205

Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Gly Ser Ser
210 215 220

Gly Trp Ser Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
225 230 235 240

<210> 13

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 13

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

His Ala Ala Arg Pro
20

<210> 14

<211> 45

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 14

ES 2 760 023 T3

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
1 5 10 15

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
20 25 30

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
35 40 45

<210> 15

<211> 24

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 15

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
20

<210> 16

<211> 42

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 16

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
35 40

<210> 17

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 17

ES 2 760 023 T3

Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Lys	Gln	Gly
1				5				10						15	
Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr
			20					25					30		
Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys
		35					40					45			
Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys
	50					55					60				
Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg
65					70					75				80	
Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala
				85					90					95	
Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg
			100					105					110		

<210> 18
 <211> 1605
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"
 <400> 18

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg	60
ccgggatccg agattcagct gcagcaatct ggggcagaac ttgtgaagcc aggggcctca	120
gtcaagctgt cctgcacagg ttctggcttc aacattgaag actactatat tcaactgggtg	180
aagcagagga ctgaacaggg cctggaatgg attggaagga ttgatcctga gaatgatgaa	240
actaaatatg gcccaatatt ccagggcagg gccactataa cagcagacac atcctccaac	300

ES 2 760 023 T3

acagtctacc tgcaactcag cagcctgaca tctgaggaca ctgccgtcta ttactgtgcc	360
tttcgcggtg gagtctactg ggggccagga accactctca cagtctcctc aggaggtggt	420
ggttccggtg gtggtggttc cggaggtggt ggttcacata tggatgttgt gatgaccag	480
tctccactca ctctatcggg tgccattgga caatcagcct ccatctcttg caagtcaagt	540
cagagcctct tagatagtga tggaaagaca tatttgaatt ggttgttaca gaggccaggc	600
cagtctccaa agcgccctaat ctctctggtg tctaaactgg actctggagt ccctgacagg	660
ttcactggca gtggatcagg gacagatttc aactgagaa tcagcagagt ggaggctgag	720
gatttgggaa tttattattg ctggcaaggt acacattttc ctgggacgtt cggtggaggg	780
accaagctgg agataaaagc tagcaccacg acgccagcgc cgcgaccacc aacaccggcg	840
cccaccatcg cgtcgagcc cctgtccctg cggccagagg cgtgccggcc agcggcgggg	900
ggcgagctgc acacgagggg gctggacttc gcctgtgatt tttgggtgct ggtggtggtt	960
ggtggagtcc tggcttgcta tagcttgcta gtaacagtgg cctttattat tttctgggtg	1020
aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc ccgccgcccc	1080
ggggccaccc gcaagcatta ccagccctat gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc	1140
tccaaacggg gcagaaagaa actcctgtat atattcaaac aaccatttat gagaccagta	1200
caaactactc aagaggaaga tggctgtagc tgccgatttc cagaagaaga agaaggagga	1260
tgtgaactga gagtgaagtt cagcaggagc gcagacgccc ccgcgtacaa gcagggccag	1320
aaccagctct ataacgagct caatctagga cgaagagagg agtacgatgt tttggacaag	1380
agacgtggcc gggaccctga gatgggggga aagccgagaa ggaagaaccc tcaggaaggc	1440
ctgtacaatg aactgcagaa agataagatg gcggaggcct acagtgagat tgggatgaaa	1500
ggcgagcgcc ggaggggcaa ggggcacgat ggccctttacc aggggtctcag tacagccacc	1560
aaggacacct acgacgccct tcacatgcag gccctgcccc ctcgc	1605

<210> 19

<211> 1473

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 19

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg	60
ccgggatccg agattcagct gcagcaatct ggggcagAAC ttgtgaagcc aggggcctca	120
gtcaagctgt cctgcacagg ttctggcttc aacattgaag actactatat tcaactgggtg	180

ES 2 760 023 T3

aagcagagga ctgaacaggg cctggaatgg attggaagga ttgatcctga gaatgatgaa	240
actaaatatg gcccaatat ccagggcagg gccactataa cagcagacac atcctccaac	300
acagtctacc tgcaactcag cagcctgaca tctgaggaca ctgccgtcta ttactgtgcc	360
tttcgcggtg gagtctactg ggggccagga accactctca cagtctcctc aggaggtggt	420
ggttccggtg gtggtggttc cggaggtggt ggttcacata tggatgttgt gatgaccag	480
tctccactca ctctatcggg tggcattgga caatcagcct ccatctcttg caagtcaagt	540
cagagcctct tagatagtga tggaaagaca tatttgaatt ggttgttaca gaggccaggc	600
cagtctccaa agcgcctaatt ctctctggtg tctaaactgg actctggagt ccctgacagg	660
ttcactggca gtggatcagg gacagatttc aactgagaa tcagcagagt ggaggctgag	720
gatttgggaa ttattatttg ctggcaaggt acacattttc ctgggacgtt cggaggagg	780
accaagctgg agataaaagc tagcaccacg acgccagcgc cgcgaccacc aacaccggcg	840
cccaccatcg cgtcgcagcc cctgtccctg cgcccagagg cgtgccggcc agcggcggg	900
ggcgcagtg acacgagggg gctggacttc gcctgtgata tctacatctg ggcgccttg	960
gccgggactt gtggggtcct tctcctgtca ctggttatca ccctttactg caaacggggc	1020
agaaagaaac tcctgtatat attcaaacia ccatttatga gaccagtaca aactactcaa	1080
gaggaagatg gctgtagctg ccgatttcca gaagaagaag aaggaggatg tgaactgaga	1140
gtgaagttca gcaggagcgc agacgcccc gcgtacaagc agggccagaa ccagctctat	1200
aacgagctca atctaggacg aagagaggag tacgatgttt tggacaagag acgtggccgg	1260
gaccctgaga tggggggaaa gccgagaagg aagaaccctc aggaaggcct gtacaatgaa	1320
ctgcagaaag ataagatggc ggaggcctac agtgagattg ggatgaaagg cgagcgccgg	1380
aggggcaagg ggcacgatgg cctttaccag ggtctcagta cagccaccaa ggacacctac	1440
gacgccttc acatgcaggc cctgccccct cgc	1473

<210> 20

<211> 1465

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 20

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctoca cgcgccagg	60
ccgggatccg acatccagat gaccagagc cctagcagcc tgagcgccag cgtgggagac	120
agagtgacca tcacctgtcg ggccagccag ggcacagaa acaacctggc ctggtatcag	180
cagaagcccg gcaaggcccc caagagactg atctacgctg ccagcaatct gcagagcggc	240

ES 2 760 023 T3

```

gtgccagca gattcacgg aagcggctcc ggcaccgagt tcaccctgat cgtgtccagc      300
ctgcagcccg aggacttcgc cacctactac tgcctgcagc accacagcta ccctctgacc      360
agcggcggag gcaccaaggt ggagatcaag cggaccggca gcaccagcgg cagcggcaag      420
cctggcagcg gcgagggag cgaggtccag gtgctggaat ctggcggcgg actggtgcag      480
cctggcggca gcctgagact gagctgtgcc gccagcggct tcaccttcag cagctacgcc      540
atgtcttggg tccggcaggc tcctggaaag ggcctggaat ggggtgtccg catcagcggc      600
tctggcggct ccaccaacta cgccgacagc gtgaagggcc ggttcacat cagccgggac      660
aacagcaaga acaccctgta tctgcagatg aacagcctga gagccgagga caccgccgtg      720
tactactgtg ccggcagcag cgggtggagc gagtactggg gccagggcac actggtcaca      780
gtgtctagcg ctagcaccac gacgccagcg ccgcgaccac caacaccggc gccaccatc      840
gcgtcgcagc ccctgtccct gcgccagag gcgtgccggc cagcggcggg gggcgcagtg      900
cacacgaggg ggctggactt cgcctgtgat atctacatct gggcgccctt ggccgggact      960
tgtggggtcc ttctcctgtc actggttatc accctttact gcaaacgggg cagaaagaaa    1020
ctcctgtata tattcaaaca accatattatg agaccagtac aaactactca agaggaagat    1080
ggctgtagct gccgatttcc agaagaagaa gaaggaggat gtgaactgag agtgaagttc    1140
agcaggagcg cagacgcccc cgctacaag cagggccaga accagctcta taacgagctc    1200
aatctaggac gaagagagga gtacgatgtt ttggacaaga gacgtggccg ggaccctgag    1260
atggggggaa agccgagaag gaagaaccct caggaaggcc tgtacaatga actgcagaaa    1320
gataagatgg cggaggccta cagtgagatt gggatgaaag gcgagcgccg gaggggcaag    1380
gggcacgatg gcctttacca gggctctcagt acagccacca aggacaccta cgacgccctt    1440
cacatgcagg ccctgcccc tcgct                                           1465

```

<210> 21

<211> 114

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 21

```

Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1               5               10              15

```

```

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Gly Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp Tyr
                20              25              30

```

ES 2 760 023 T3

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Thr Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys Tyr Gly Pro Ile Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Pro Gly Thr Thr Leu Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 22
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
<400> 22

Asp Tyr Tyr Ile His
1 5

<210> 23
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
<400> 23

Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys Tyr Gly Pro Ile Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 24
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
<400> 24

Arg Gly Gly Val Tyr
1 5

<210> 25
<211> 112
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 25

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Thr Leu Ser Val Ala Ile Gly
1 5 10 15

Gln Ser Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 26

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 26

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 27

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 28

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly Thr
1 5

<210> 29

<211> 114

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 29

Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Gly Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Thr Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys Tyr Gly Pro Ile Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Pro Gly Thr Thr Leu Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 30

Gly Phe Asn Ile Glu Asp Tyr
1 5

<210> 31

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 <400> 31

Asp Pro Glu Asn Asp Glu
 1 5

<210> 32
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 <400> 32

Arg Gly Gly Val Tyr
 1 5

<210> 33
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 33

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Thr Leu Ser Val Ala Ile Gly
 1 5 10 15

Gln Ser Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95

Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 34
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 <400> 34

Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr
1 5 10

<210> 35
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
<400> 35

Leu Val Ser
1

<210> 36
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
<400> 36

Gly Thr His Phe Pro Gly
1 5

<210> 37
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
<400> 37

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 38
<211> 246
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
<400> 38

ES 2 760 023 T3

Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys Tyr Gly Pro Ile Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 100 105 110
 Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser
 130 135 140
 Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser
 145 150 155 160
 Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln
 165 170 175
 Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys
 180 185 190
 Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 195 200 205
 Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val
 210 215 220
 Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly
 225 230 235 240
 Thr Lys Val Glu Ile Lys
 245

<210> 39

<211> 738

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 39

gaaatccagc tggccaatc gggagctgag gtcaagaagc cgggagccac cgtcaagatc	60
tcatgcaagg ggtcgggatt caacatcgag gactactaca ttactgggt gcagcaagct	120
ccgggaaaag gcctggaatg gatgggcaga atcgaccag aaaacgacga aactaagtac	180
ggaccgattt tccaaggaag agtgactatc accgccgata cttcaaccaa taccgtctac	240
atggaactga gctcgctccg gtccgaagat actgcagtgt attactgtgc ctttcgcgga	300
ggggtgtact ggggccaagg aactactgtc actgtctcgt caggaggcgg agggtcggga	360
ggaggcggga gcggaggcgg tggctcgggt ggcggaggaa gcgacgtggt gatgaccag	420
tccccggact ccctcgccgt gagcctcgga gagaggcgga ctatcaattg caagtcgtcc	480
cagtcacttc tggattccga tggtaaaacg tacctcaact ggctgcagca aaagccaggg	540
cagccacca aacggttgat ctcccttgtg tccaaactgg atagcggagt gcctgaccgc	600
ttctcgggtt ccggtagcgg gaccgacttc accctgacga tcagctcact gcaggcggag	660
gacgtggcag tgtactactg ctggcaggga acccacttcc ctggcacctt tggaggtggc	720
accaaggtgg agatcaag	738

<210> 40

<211> 831

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 40

atggccctcc ctgtcacccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg	60
cccgaatcc agctggtcca atcgggagct gaggtcaaga agccgggagc caccgtcaag	120
atctcatgca aggggtcggg attcaacatc gaggactact acattcactg ggtgcagcaa	180
gctccgggaa aaggcctgga atggatgggc agaatcgacc cagaaaacga cgaaactaag	240
tacggaccga ttttccaagg aagagtgact atcacccgcg atacttcaac caataccgtc	300
tacatggaac tgagctcgct ccggtccgaa gatactgcag tgtattactg tgcctttcgc	360
ggaggggtgt actggggcca aggaactact gtcactgtct cgtcaggagg cggagggtcg	420
ggaggaggcg ggagcggagg cgggtggctcg ggtggcggag gaagcgacgt ggtgatgacc	480
cagtccccgg actccctcgc cgtgagcctc ggagagaggg cgactatcaa ttgcaagtcg	540
tccagtcac ttctggattc cgatggtaaa acgtacctca actggctgca gcaaaagcca	600
gggcagccac ccaaacggtt gatctccctt gtgtccaaac tggatagcgg agtgcctgac	660
cgcttctcgg gttccggtag cgggaccgac ttcaccctga cgatcagctc actgcaggcg	720
gaggacgtgg cagtgtacta ctgtggcag ggaaccact tccctggcac ctttggaggt	780
ggcaccaagg tggagatcaa gggatcgac caccatcacc atcatcatca c	831

<210> 41

<211> 277

ES 2 760 023 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 41

```

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

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

Lys Lys Pro Gly Ala Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe
          35          40          45

Asn Ile Glu Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys
          50          55          60

Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys
          65          70          75          80

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

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly
          115          120          125

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
          130          135          140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr
          145          150          155          160

Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile
          165          170          175

Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr
          180          185          190

Leu Asn Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu Ile
          195          200          205

Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
          210          215          220

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
          225          230          235          240

```

ES 2 760 023 T3

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly
245 250 255

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Ser His His His
260 265 270

His His His His His
275

<210> 42
<211> 1470
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"
<400> 42

```

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg      60
cccgagatcc agctggtgca gtcgggagct gaagtcaaaa agcctggcgc aaccgtcaag      120
atctcgtgca aaggatcagg gttcaacatc gaggactact acatccattg ggtgcaacag      180
gcacccggaa aaggcctgga gtggatgggg aggattgacc cagaaaatga cgaaaccaag      240
tacggaccga tcttccaagg acgggtgacc atcacggctg acacttccac taacaccgtc      300
tacatggaac tctcgagcct tcgctcgga gataccgcgg tgtactactg cgcttttaga      360
ggtggagtct actggggaca agggactacc gtcaccgtgt cgtcagggtg cgagggatca      420
ggcggaggcg gctccggtgg aggaggaagc ggaggaggtg gctccgacgt ggtgatgacg      480
cagtcaccgg actccttggc ggtgagcctg ggtgaacgcg ccactatcaa ctgcaagagc      540
tcccagagct tgctggactc cgatggaaag acttatctca attggtgca acagaagcct      600
ggccagccgc caaagagact catctcactg gtgagcaagc tggatagcgg agtgccagat      660
cggttttcgg gatcgggctc aggcaaccgac ttcaccctga ctatttcctc cctccaagcc      720
gaggatgtgg ccgtctacta ctgttggcag gggactcact tcccggggac cttcggtgga      780
ggcactaagg tggagatcaa aaccactacc ccagcaccga ggccaccac cccggctcct      840
accatgcct cccagcctct gtccctgcgt ccggaggcat gtagaccgc agctggtggg      900
gccgtgcata cccggggtct tgacttcgcc tgcgatatct acatttgggc ccctctggct      960
ggtacttgcg gggtcctgct gctttcactc gtgatcactc tttactgtaa gcgcggtcgg     1020
aagaagctgc tgtacatctt taagcaaccc ttcattgaggc ctgtgcagac tactcaagag     1080
gaggacggct gttcatgccg gttcccagag gaggaggaag gcggctgcga actgcgcgtg     1140
aaattcagcc gcagcgcaga tgctccagcc tacaagcagg ggcaaacca gctctacaac     1200
gaactcaatc ttggtcggag agaggagtac gacgtgctgg acaagcggag aggacgggac     1260
ccagaaatgg gcgggaagcc gcgcagaaag aatccccaag agggcctgta caacgagctc     1320
caaaaggata agatggcaga agcctatagc gagattggtg tgaaagggga acgcagaaga     1380
ggcaaaggcc acgacggact gtaccaggga ctcagcaccg ccaccaagga cacctatgac     1440
gctcttcaca tgcaggccct gccgcctcgg                                     1470

```

ES 2 760 023 T3

<210> 43
 <211> 490
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 43

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

ES 2 760 023 T3

Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile
 165 170 175
 Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr
 180 185 190
 Leu Asn Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu Ile
 195 200 205
 Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 210 215 220
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
 225 230 235 240
 Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly
 245 250 255
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Thr Thr Thr Pro Ala
 260 265 270
 Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser
 275 280 285
 Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr
 290 295 300
 Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala
 305 310 315 320
 Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
 325 330 335
 Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
 340 345 350
 Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
 355 360 365
 Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg
 370 375 380
 Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
 385 390 395 400
 Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
 405 410 415

ES 2 760 023 T3

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

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

Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
450 455 460

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

Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485 490

<210> 44

<211> 246

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 44

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

ES 2 760 023 T3

Gly Gly Gly Ser Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
130 135 140

Lys Pro Gly Ala Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn
145 150 155 160

Ile Glu Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly
165 170 175

Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys Tyr
180 185 190

Gly Pro Ile Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr
195 200 205

Asn Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
210 215 220

Val Tyr Tyr Cys Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
225 230 235 240

Thr Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 45
<211> 738
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"
<400> 45

gatgtcgtga tgaccagtc cccagactcc ctgcagtggt ccttgggaga acgggccacc 60
atcaactgca aatcgagcca gtcactgctg gactcagacg gaaagaccta cctcaactgg 120
ctgcagcaga agcctggcca gccaccgaag cgctgatctt ccctggtgtc caagctggac 180
tcgggctgcc cggacaggtt tagcggtagc ggctcgggaa ccgacttcac tctgaccatt 240
agctcgctcc aagctgaaga tgtggcggtc tactactgct ggagggggac ccacttcccc 300
gggacctttg gcggaggaac taaagtcgaa atcaaaggag gaggcggatc aggtggagga 360
ggcagcggag gaggagggag cggcggtggc ggctccgaaa ttcaacttgt gcaatccggt 420
gccgaggtga agaaacctgg tgccactgtc aagatctcgt gtaagggatc gggattcaat 480
atcgaggact actacatcca ctgggtgcaa caggcgccag gaaagggatt ggagtggatg 540
ggtcgcatcg acccgaaaa cgatgagact aagtacggac cgatcttcca aggccgggtc 600
acgatcactg cggatacctc cactaatacc gtgtatatgg agctctcgtc actgagaagc 660
gaagatacgg ccgtgtacta ctgcgcattc agaggaggtg tgtactgggg ccagggaact 720
actgtgaccg tgtcgtcg 738

<210> 46
<211> 831

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"
 <400> 46

```

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg      60
cccgatgtcg tgatgaccca gtcccagac tccctcgag tgccttggg agaacggggc      120
accatcaact gcaaatcgag ccagtcactg ctggactcag acggaaagac ctacctcaac      180
tggctgcagc agaagcctgg ccagccaccg aagcgctga tctccctggt gtccaagctg      240
gactcgggcg tcccggacag gtttagcggg agcggctcgg gaaccgactt cactctgacc      300
attagctcgc tccaagctga agatgtggcg gtctactact gctggcaggg gaccacttc      360
cccgggacct ttggcggagg aactaaagtc gaaatcaaag gaggaggcgg atcaggtgga      420
ggaggcagcg gaggaggagg gagcggcggg ggcggctccg aaattcaact tgtgcaatcc      480
ggtgccgagg tgaagaaacc tggtgccact gtcaagatct cgtgtaaggg atcgggattc      540
aatatcgagg actactacat ccactgggtg caacaggcgc caggaaaggg attggagtgg      600
atgggtcgca tcgaccgga aaacgatgag actaagtacg gaccgatctt ccaaggccgg      660
gtcacgatca ctgcggatac ctccactaat accgtgtata tggagctctc gtcactgaga      720
agcgaagata cggccgtgta ctactgcgca ttcagaggag gtgtgtactg gggccaggga      780
actactgtga ccgtgtcgtc ggggtcacat caccaccatc atcatcacca c      831
    
```

<210> 47
 <211> 277
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 47

```

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

ES 2 760 023 T3

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

<210> 48
 <211> 1470
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"
 <400> 48

```

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg      60
cccgacgtgg tcatgactca aagcccagat tccttggctg tctcccttgg agaaagagca      120
acgatcaatt gcaaaaagctc gcagtccctg ttggactccg atggaaaaac ctacctcaac      180
tggctgcagc agaagccggg acaaccacca aagcggctga tttccctcgt gtccaagctg      240
gacagcggcg tgccggatcg cttctcgggc agcggctcgg gaaccgattt tactctcact      300
atttcgtcac tgcaagcgga ggacgtggcg gtgtattact gctggcaggg cactcacttc      360
ccgggtactt ttggtggagg taccaaagtc gaaatcaagg gtggaggcgg gagcggagga      420
ggcgggtcgg gaggaggagg atcgggtggc ggaggctcag aaatccagct ggtgcagtca      480
ggtgccgaag tgaagaagcc tggggccacg gtgaagatct cgtgcaaggg gagcggattc      540
aacatcgagg attactacat ccattgggtg caacaggccc ctggcaaagg gctggaatgg      600
atgggaagga tgcaccccga gaatgacgag actaagtacg gcccgatctt ccaaggacgg      660
gtgaccatca ctgcagacac ttcaaccaac accgtctaca tggaactctc ctgctgcgc      720
tccgaggaca ccgccgtgta ctactgtgct ttcagaggag gagtctactg gggacaggga      780
acgaccgtga ccgtcagctc aaccactacc ccagcaccga ggccaccac cccggctcct      840
accatgcctt cccagcctct gtccctgctt ccggaggcat gtagaccgc agctgggtgg      900
gccgtgcata cccgggtctt tgacttcgcc tgcgatatct acatttgggc ccctctggct      960
ggtacttgcg gggtcctgct gctttcactc gtgatcactc tttactgtaa gcgcggctcg      1020
aagaagctgc tgtacatctt taagcaacct tcatgaggc ctgtgcagac tactcaagag      1080
gaggacggct gttcatgccg gttcccagag gaggaggaag gcggctgcga actgcgcgtg      1140
aaattcagcc gcagcgcaga tgctccagcc tacaagcagg ggcagaacca gctctacaac      1200
gaactcaatc ttggtcggag agaggagtac gacgtgctgg acaagcggag aggacgggac      1260
ccagaaatgg gcgggaagcc gcgcagaaag aatccccaag agggcctgta caacgagctc      1320
caaaaggata agatggcaga agcctatagc gagattggtg tgaaagggga acgcagaaga      1380
ggcaaaggcc acgacggact gtaccaggga ctcagcaccg ccaccaagga cacctatgac      1440
gctcttcaca tgcaggccct gccgcctcgg      1470
    
```

<210> 49
 <211> 490
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 49

ES 2 760 023 T3

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

ES 2 760 023 T3

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn
195 200 205

Asp Glu Thr Lys Tyr Gly Pro Ile Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr
210 215 220

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

Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr
245 250 255

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

Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser
275 280 285

Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr
290 295 300

Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala
305 310 315 320

Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
325 330 335

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
340 345 350

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
355 360 365

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg
370 375 380

Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
385 390 395 400

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

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

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

Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
450 455 460

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

Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485 490

ES 2 760 023 T3

<210> 50
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 50

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

ES 2 760 023 T3

Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln
165 170 175

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

Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
195 200 205

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

Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly
225 230 235 240

Thr Lys Val Glu Ile Lys
245

<210> 51
<211> 738
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"
<400> 51

gagattcagc tgggtccaaag cggcgcagaa gtgaaaaagc caggggaatc gttgcgcac	60
agctgtaaaag gttccggctt caacatcgag gactattaca tccattgggt gcgcgcagatg	120
ccaggaaagg ggctggaatg gatgggacgg attgaccgg agaacgacga aaccaagtac	180
ggaccgatct ttcaaggaca cgtgactatc tccgccgaca ccagcatcaa tacggtgtac	240
ctccaatggt cctcactcaa ggcctcggat accgcgatgt actactgccc gttcagagga	300
ggcgtctact ggggacaagg gactactgtg actgtctcat caggaggtgg aggaagcgga	360
ggaggtggct cgggcggagg tggatcgga ggaggagggt ccgatgtggt gatgaccag	420
tccccactgt cgctcccggg gaccctcgga cagcctgcta gcatctcgtg caaatcctcg	480
caatccctgc tggactcgga cggaaaaacg tacctcaatt ggctgcagca gcgccctggc	540
cagagcccga gaaggcttat ctgctggtg tcaaagctgg atagcgggtg gcccgaccgg	600
ttcagcggtc caggttcagg aaccgatttc acctgaaga tctcccgcgt ggaagccgaa	660
gatgtcggag tctactactg ctggcagggt actcacttcc cggggacctt tgggtggcggc	720
actaagggtc agattaag	738

<210> 52
<211> 831
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"
<400> 52

ES 2 760 023 T3

```

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg      60
cccgagattc agctgggtcca aagcggcgca gaagtgaata agccagggga atcggttgccg      120
atcagctgta aaggttccgg cttcaacatc gaggactatt acatccattg ggtgcggcag      180
atgccaggaa agggggtgga atggatggga cggattgacc cggagaacga cgaaaccaag      240
tacggaccga tctttcaagg acacgtgact atctccgccg acaccagcat caatacgggtg      300
tacctccaat ggtcctcact caaggcctcg gataccgca tgtactactg cgcgttcaga      360
ggaggcgtct actggggaca agggactact gtgactgtct catcaggagg tggaggaagc      420
ggaggagggtg gctcgggcgg aggtggatcg ggaggaggag ggtccgatgt ggtgatgacc      480
cagtccccac tgtcgtctcc ggtgaccctc ggacagcctg ctagcatctc gtgcaaatcc      540
tcgcaatccc tgctggactc ggacggaaaa acgtacctca attggctgca gcagcgcctt      600
ggccagagcc cgagaaggct tatctcgtcg gtgtcaaagc tggatagcgg tgtgcccgac      660
cggttcagcg gctcagggtc aggaaccgat ttcacctga agatctcccg cgtggaagcc      720
gaagatgtcg gagtctacta ctgctggcag ggtactcact tcccggggac ctttgggtggc      780
ggcactaagg tcgagattaa gggctcacac catcatcacc atcaccacca c              831

```

<210> 53

<211> 277

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 53

```

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

```

```

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

```

```

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

```

ES 2 760 023 T3

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

<210> 54
 <211> 1470
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"
 <400> 54

ES 2 760 023 T3

atggccctcc ctgtcacgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg	60
cccgaatcc agctggtgca aagcggagcc gaggtgaaga agcccggaga atccctgcgc	120
atctcgtgta agggttccgg ctttaacatc gaggattact acatccactg ggtgagacag	180
atgccgggca aaggtctgga atggatgggc cgcacgcacc cggagaacga cgaaaccaa	240
tacggaccaa tcttccaagg acatgtgact atttccgcgg atacctccat caacactgtc	300
tacttgcagt ggagctcgct caaggcgtcg gataccgcca tgtactactg cgcattcaga	360
ggaggtgtgt actggggcca gggcactacg gtcaccgtgt cctcgggagg tggaggggtca	420
ggaggcggag gctcgggagg tggaggatca ggcggaggag gaagcgatgt ggtcatgact	480
caatccccac tgtcactgcc tgtcactctg gggcaaccgg cttccatctc atgcaagtca	540
agccaatcgc tgctcgactc cgacggaaaa acctacctca attggcttca gcagcgccca	600
ggccagtcgc ctcgagggt gatctcactc gtgtcgaagc ttgactccgg ggtgccggat	660
cggtttagcg gaagcggatc ggggaccgac ttcacgttga agattagccg ggtggaagcc	720
gaggacgtgg gagtctatta ctgctggcag gggaccact tcccggggac tttcggagga	780
ggcaccaaag tcgagattaa gaccactacc ccagcaccga ggccaccac cccggctcct	840
accatcgcct ccagcctct gtccctgctt ccggaggcat gtagaccgc agctgggtggg	900
gccgtgcata cccggggtct tgacttcgcc tgcgatctt acatttgggc ccctctggct	960
ggtacttgcg gggctctgct gctttcactc gtgatcactc tttactgtaa gcgcgggtcgg	1020
aagaagctgc tgtacatctt taagcaacct ttcattgaggc ctgtgcagac tactcaagag	1080
gaggacggct gttcatgccg gttcccagag gaggaggaag gcggctgcga actgcgcgtg	1140
aaattcagcc gcagcgcaga tgctccagcc tacaagcagg ggcagaacca gctctacaac	1200
gaactcaatc ttggtcggag agaggagtac gacgtgctgg acaagcggag aggacgggac	1260
ccagaaatgg gcgggaagcc gcgcagaaag aatccccaag agggcctgta caacgagctc	1320
caaaaggata agatggcaga agcctatagc gagattggtg tgaaagggga acgcagaaga	1380
ggcaaaggcc acgacggact gtaccaggga ctcagcaccg ccaccaagga cacctatgac	1440
gctcttcaca tgcaggccct gccgcctcgg	1470

<210> 55

<211> 490

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 55

ES 2 760 023 T3

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

ES 2 760 023 T3

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala
 225 230 235 240
 Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly
 245 250 255
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Thr Thr Thr Pro Ala
 260 265 270
 Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser
 275 280 285
 Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr
 290 295 300
 Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala
 305 310 315 320
 Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
 325 330 335
 Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
 340 345 350
 Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
 355 360 365
 Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg
 370 375 380
 Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
 385 390 395 400
 Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
 405 410 415
 Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro
 420 425 430
 Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
 435 440 445
 Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
 450 455 460
 Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
 465 470 475 480
 Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485 490

<210> 56
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

ES 2 760 023 T3

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 56

Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Leu	Gly	1	5	10	15
Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Asp	Ser	20	25	30	
Asp	Gly	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn	Trp	Leu	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser	35	40	45	
Pro	Arg	Arg	Leu	Ile	Ser	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Asp	Ser	Gly	Val	Pro	50	55	60	
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	65	70	75	80
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Trp	Gln	Gly	85	90	95	
Thr	His	Phe	Pro	Gly	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	100	105	110	
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	115	120	125	
Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Ile	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	130	135	140	
Lys	Pro	Gly	Glu	Ser	Leu	Arg	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Phe	Asn	145	150	155	160
Ile	Glu	Asp	Tyr	Tyr	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	165	170	175	
Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Glu	Asn	Asp	Glu	Thr	Lys	Tyr	180	185	190	
Gly	Pro	Ile	Phe	Gln	Gly	His	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Ile	195	200	205	
Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	210	215	220	
Met	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Phe	Arg	Gly	Gly	Val	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	225	230	235	240
Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	245													

<210> 57

<211> 738

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 57

gacgtcgtca tgaccagag cccgctgtca ctgcctgtga ccctgggcca gccggcgctcc	60
attagctgca aatcctcgca atccctgctc gactcagacg gaaaaacgta cttgaactgg	120
ctccaacagc gccctgggca atccccaagg cggcttatct cactcgtcag caagctcgat	180
agcgggtgtcc cagacagatt ttcgggctcg ggatcgggca ctgatttcac tctgaagatc	240
tcgcgggtgg aagccgagga tgtgggagtg tactattgct ggagggcac tcaattcccc	300
gggacgtttg gcggaggaac taaggctgag atcaaaggag gaggtggatc aggcggaggt	360
gggagcggag gaggaggaag cgggtgtgga ggttccgaaa tccagctggt gcaatcagga	420
gccgaggtga agaagccggg agaatccctg cgcatctcgt gcaagggctc gggcttcaac	480
atcgaggatt actacatcca ctgggtgcgg cagatgccgg gaaaggggtt ggaatggatg	540
ggacgcattg acccgaaaa tgatgaaacc aaatacgggc caatcttcca aggccacgtg	600
accattagcg ctgacacttc catcaacacc gtgtaccttc agtggtcctc actgaaggcg	660
tcggacactg ccatgtacta ctgtgcattc agaggagggg tctactgggg acagggcacc	720
accgtgaccg tgagctcc	738

<210> 58

<211> 831

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 58

ES 2 760 023 T3

```

atggccctcc ctgtcacgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg      60
cccgacgtcg tcatgacca gagcccgctg tcaactgcctg tgaccctggg ccagccggcg      120
tccattagct gcaaactctc gcaatccctg ctogactcag acggaaaaac gtacttgaac      180
tggctccaac agcgccctgg gcaatcccca agggcggtta tctcactcgt cagcaagctc      240
gatagcgggtg tcccagacag attttcgggc tcgggatcgg gcactgattt cactctgaag      300
atctcgcggg tggaagccga ggatgtggga gtgtactatt gctggcaggg cactcacttc      360
cccgggacgt ttggcggagg aactaaggtc gagatcaaag gaggaggtgg atcaggcgga      420
ggtgggagcg gaggaggagg aagcggtggt ggaggttccg aaatccagct ggtgcaatca      480
ggagccgagg tgaagaagcc gggagaatcc ctgcgcactc cgtgcaaggg ctcgggcttc      540
aacatcgagg attactacat ccactgggtg cggcagatgc cgggaaaggg gttggaatgg      600
atgggacgca ttgaccgga aaatgatgaa accaaatacg ggccaatctt ccaaggccac      660
gtgaccatta gcgctgacac ttccatcaac accgtgtacc ttcagtggtc ctactgaag      720
gcgtcggaca ctgccatgta ctactgtgca ttcagaggag gggctctactg gggacagggc      780
accaccgtga ccgtgagctc cggctcgcat caccatcatc accaccatca c          831

```

<210> 59

<211> 277

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 59

```

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

```

```

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

```

```

Pro Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln
35           40           45

```

```

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

```

```

Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys Leu
65           70           75           80

```

ES 2 760 023 T3

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

<210> 60
 <211> 1470
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"
 <400> 60

ES 2 760 023 T3

```

atggccctcc ctgtcacgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgcgctcgg      60
cccgacgtcg tcatgaccca atccctctc tccctgccgg tcaccctggg tcagccggcg      120
tcgatctcat gcaaaagctc acagtccctg ctggattcgg acggaaaaac ctacttgaac      180
tggctccaac agaggccggg tcagtcccct cgcagactga tctcgctggg gagcaagctc      240
gactcgggtg tgccggatcg gttctccggg tcaggatcgg gcaccgactt tacgctcaag      300
atttcgagag tggaggccga ggatgtggga gtgtactatt gctggcaggg cacgcatttc      360
cccgggacct ttggaggcgg gactaagggtg gaaatcaagg gaggtggcgg atcaggcgga      420
ggaggcagcg gcggagggtg atcaggaggc ggagggtcag agatccagct ggtccaaagc      480
ggagcagagg tgaagaagcc aggcgagtc cttcgcattt cgtgcaaagg gagcggcttc      540
aacattgaag attactacat ccactgggtg cggcaaatgc caggaaaggg tctggaatgg      600
atgggacgga tcgaccaga aaatgatgaa actaagtacg gaccgatctt ccaaggacac      660
gtcactatct ccgcgacac ttgatcaac accgtgtacc tccagtggag cagcttgaaa      720
gcctccgaca ccgctatgta ctactgtgcc ttccgaggag gagtctactg gggacagggg      780
actactgtga ccgtgtcgtc caccactacc ccagcaccga ggccaccac cccggctcct      840
accatcgcct ccagcctct gtccctgctt ccggaggcat gtagaccgc agctgggtgg      900
gccgtgcata cccgggtct tgacttcgcc tgcgatatct acatttgggc ccctctggct      960
ggtacttgcg gggctctgct gctttcactc gtgatcactc tttactgtaa gcgcggctcg      1020
aagaagctgc tgtacatctt taagcaacc ttcatgaggc ctgtgcagac tactcaagag      1080
gaggacggct gttcatgccg gttcccagag gaggaggaag gcggctgcga actgcgcgtg      1140
aaattcagcc gcagcgcaga tgctccagcc tacaagcagg ggcagaacca gctctacaac      1200
gaactcaatc ttggtcggag agaggagtac gacgtgctgg acaagcggag aggacgggac      1260
ccagaaatgg gcgggaagcc gcgcagaaag aatccccaag agggcctgta caacgagctc      1320
caaaaggata agatggcaga agcctatagc gagattggtg tgaaagggga acgcagaaga      1380
ggcaaaggcc acgacggact gtaccaggga ctcagcaccg ccaccaagga cacctatgac      1440
gctcttcaca tgcaggccct gccgcctcgg      1470

```

<210> 61

<211> 490

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 61

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

ES 2 760 023 T3

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

ES 2 760 023 T3

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala
 260 265 270
 Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser
 275 280 285
 Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr
 290 295 300
 Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala
 305 310 315 320
 Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
 325 330 335
 Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
 340 345 350
 Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
 355 360 365
 Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg
 370 375 380
 Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
 385 390 395 400
 Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
 405 410 415
 Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro
 420 425 430
 Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
 435 440 445
 Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
 450 455 460
 Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
 465 470 475 480
 Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485 490

<210> 62

<211> 246

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 62

ES 2 760 023 T3

Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys Tyr Gly Pro Ile Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 100 105 110
 Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser
 130 135 140
 Leu Pro Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser
 145 150 155 160
 Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln
 165 170 175
 Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys
 180 185 190
 Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 195 200 205
 Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val
 210 215 220
 Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly
 225 230 235 240
 Thr Lys Val Glu Ile Lys
 245

<210> 63

<211> 738

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 63

gaaatccagc tcgtgcagag cggagccgag gtcaagaaac cgggtgctac cgtgaagatt	60
tcatgcaagg gatcgggctt caacatcgag gattactaca tccactgggt gcagcaggca	120
ccaggaaaag gacttgaatg gatgggccgg atcgaccggg aaaatgacga gactaagtac	180
ggccctatct tccaaggacg ggtgacgatc accgcagaca ctagcaccaa caccgtctat	240
atggaactct cgtccctgag gtccgaagat actgccgtgt actactgtgc gtttcgcgga	300
ggtgtgtact ggggacaggg taccaccgtc accgtgtcat cgggcggtgg aggctccgtt	360
ggaggagggt caggaggcgg tggaaagcga ggaggcggca gcgacgtggt catgactcaa	420
tcgccgctgt cgctgccctg cactctggga caaccgcgt ccatcagctg caaatcctcg	480
cagtcactgc ttgactccga tggaaagacc tacctcaact ggctgcagca acgcccaggc	540
caatcccaa gacgcctgat ctcgttggtg tcaaagctgg actcagggtt gccggaccgg	600
ttctccggga gcgggtcggg cacggatttc actctcaaga tctccagagt ggaagccgag	660
gatgtgggag tctactactg ctggcaggga acccatttcc ctggaacttt tggcggagga	720
actaaggctc agattaaa	738

<210> 64

<211> 831

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 64

atggccctcc ctgtcacgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg	60
cccgaatcc agctcgtgca gagcggagcc gaggtcaaga aaccgggtgc taccgtgaag	120
atttcatgca agggatcggg cttcaacatc gaggattact acatccactg ggtgcagcag	180
gcaccaggaa aaggacttga atggatgggc cggatcgacc cggaaaatga cgagactaag	240
tacggcccta tcttccaagg acgggtgacg atcaccgcag aactagcac caacaccgtc	300
tatatggaac tctcgtccct gaggtccgaa gatactgccg tgtactactg tgcgtttcgc	360
ggaggtgtgt actggggaca ggtaccacc gtcaccgtgt catcgggcgg tggaggctcc	420
ggtggaggag ggtcaggagg cgttgaagc ggaggaggcg gcagcgacgt ggtcatgact	480
caatcgccgc tgtcgtgcc cgtcactctg ggacaaccgc cgtccatcag ctgcaaatcc	540
tcgcagtcac tgcttgactc cgatggaaag acctacctca actggctgca gcaacgccca	600
ggccaatccc caagacgcct gatctcgttg gtgtcaaagc tggactcagg ggtgccggac	660
cggttctccg ggagcgggtc gggcacggat ttcactctca agatctccag agtggagacc	720
gaggatgtgg gagtctacta ctgctggcag ggaaccatt tccctggaac ttttggcgga	780
ggaactaagg tcgagattaa agggagccac catcatcatc accaccacca c	831

<210> 65

<211> 277
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 65

```

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

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

Lys Lys Pro Gly Ala Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe
          35          40          45

Asn Ile Glu Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys
50          55          60

Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys
65          70          75          80

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

Thr Asn Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr
          100          105          110
    
```


ES 2 760 023 T3

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly
115 120 125

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr
145 150 155 160

Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile
165 170 175

Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr
180 185 190

Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile
195 200 205

Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
210 215 220

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala
225 230 235 240

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly
245 250 255

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Ser His His His
260 265 270

His His His His His
275

<210> 66
<211> 1470
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"
<400> 66

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg	60
cccgaatcc agctcgtgca gagcggagcc gaggtcaaga aaccgggtgc taccgtgaag	120
atttcattgca agggatcggg cttcaacatc gaggattact acatccactg ggtgcagcag	180
gcaccaggaa aaggacttga atggatgggc cggatcgacc cggaaaatga cgagactaag	240

ES 2 760 023 T3

```

tacggcccta tcttccaagg acgggtgacg atcaccgcag acactagcac caacaccgtc      300
tatatggaac tctcgtccct gaggtccgaa gatactgccg tgtactactg tgcgtttcgc      360
ggaggtgtgt actggggaca ggttaccacc gtcaccgtgt catcgggcgg tggaggctcc      420
ggtggaggag ggtcaggagg cgggtggaagc ggaggaggcg gcagcgacgt ggtcatgact      480
caatcgccgc tgtcgtctgc cgtcactctg ggacaacccg cgtccatcag ctgcaaatcc      540
tcgcagtcac tgcttgactc cgatggaaag acctacctca actggctgca gcaacgcca      600
ggccaatccc caagacgcct gatctcgttg gtgtcaaagc tggactcagg ggtgccggac      660
cggttctccg ggagcgggtc gggcacggat ttcactctca agatctccag agtgaagcc      720
gaggatgtgg gagtctacta ctgtggcag ggaacccatt tccctggaac ttttggcgga      780
ggaactaagg tcgagattaa aaccactacc ccagcaccga ggccaccac cccggctcct      840
accatgcct cccagcctct gtccctgcgt cgggaggcat gtagaccgc agctgggtgg      900
gccgtgcata cccggggtct tgacttcgcc tgcgatatct acatttgggc ccctctggct      960
ggtacttgcc gggtcctgct gctttcactc gtgatcactc tttactgtaa gcgcggtcgg     1020
aagaagctgc tgtacatctt taagcaaccc ttcattgaggc ctgtgcagac tactcaagag     1080
gaggacggct gttcatgccg gttcccagag gaggaggaag gcggctgcga actgcgcgtg     1140
aaattcagcc gcagcgaga tgctccagcc tacaagcagg ggacagaacca gctctacaac     1200
gaactcaatc ttggtcggag agaggagtac gacgtgctgg acaagcggag aggacgggac     1260
ccagaaatgg gcgggaagcc gcgcagaaag aatccccaag agggcctgta caacgagctc     1320
caaaaggata agatggcaga agcctatagc gagattggtg tgaaagggga acgcagaaga     1380
ggcaaaggcc acgacggact gtaccaggga ctcagcaccg ccaccaagga cacctatgac     1440
gctcttcaca tgcaggccct gccgcctcgg                                     1470

```

<210> 67

<211> 490

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 67

```

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

```

```

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

```

```

Lys Lys Pro Gly Ala Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe

```

ES 2 760 023 T3

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

ES 2 760 023 T3

```

Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr
 290                               295                   300

Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala
305                               310                   315                   320

Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
                               325                   330                   335

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
                               340                   345                   350

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
                               355                   360                   365

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg
370                               375                   380

Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
385                               390                   395                   400

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

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

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

Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
450                               455                   460

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

Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
                               485                   490

```

<210> 68
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 68

ES 2 760 023 T3

Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys Tyr Gly Pro Ile Phe
 50 55 60
 Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Ile Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 100 105 110
 Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser
 130 135 140
 Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser
 145 150 155 160
 Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln
 165 170 175
 Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys
 180 185 190
 Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 195 200 205
 Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val
 210 215 220
 Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly
 225 230 235 240
 Thr Lys Val Glu Ile Lys
 245

<210> 69

<211> 738

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 69

ES 2 760 023 T3

gaaatccagc tgggtgcagtc aggcgccgag gtcaagaagc cgggagagtc gctgagaatc	60
tcgtgcaagg gctcgggggt caacatcgag gactactaca ttactgggt caggcagatg	120
ccgggaaagg gactggaatg gatgggccg atcgaccag aaaatgacga aaccaaatac	180
gggccgattt ttcaaggcca cgtgactatc agcgcagaca cgagcatcaa cactgtctac	240
ctccagtgtt cctcgcttaa ggccagcgat accgctatgt actactgccc attcagaggc	300
ggggtgtact ggggacaagg aaccactgtg accgtgagca gcggagggtg cggctcggga	360
ggagggtgga gcggaggagg aggttccggc ggtggaggat cagatgtcgt gatgaccag	420
tccccggact ccctcgctgt ctactgggc gagcgcgcga ccatcaactg caaatcgagc	480
cagtcgctgt tggactccga tggaaagact tatctgaatt ggctgcaaca gaaaccagga	540
caacctcca agcggctcat ctcgcttggt tcaaaactcg attcgggagt gccagaccgc	600
ttctcggggc ccgggagcgg aactgacttt actttgacca ttctctcact gcaagcggag	660
gatgtggccg tgtattactg ttggcagggc acgcatttcc ctggaacctt cgggtggcga	720
actaagggtg aaatcaag	738

<210> 70

<211> 834

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 70

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgcgctcgg	60
cccgaatcc agctggtgca gtcaggcgcc gaggtcaaga agccgggaga gtcgctgaga	120
atctcgtgca agggctcggg gttcaacatc gaggactact acattcactg ggtcaggcag	180
atgccgggaa agggactgga atggatgggc cggatcgacc cagaaaatga cgaacccaaa	240
tacggggcca tttttcaagg ccacgtgact atcagcgcag acacgagcat caacactgtc	300
tacctccagt ggtcctcgct taaggccagc gataccgcta tgtactactg cgcattcaga	360
ggcgggggtg actggggaca aggaaccact gtgaccgtga gcagcggagg tggcggctcg	420
ggaggagggt ggagcggagg aggagggtcc ggcggtggag gatcagatgt cgtgatgacc	480
cagtccccgg actccctcgc tgtctcactg ggcgagcgcg cgaccatcaa ctgcaaatcg	540
agccagtcgc tggttgactc cgatggaaag acttatctga attggctgca acagaaacca	600
ggacaacctc ccaagcggct catctcgctt gtgtcaaaac tcgattcggg agtgccagac	660
cgcttctcgg ggtccgggag cggaactgac ttactttga ccatttcctc actgcaagcg	720
gaggatgtgg ccgtgtatta ctgttgagcagg ggcacgcatt tccctggaac cttcgggtggc	780
ggaactaagg tggaaatcaa gggatcacac caccatcatc accatcacca ccat	834

<210> 71

<211> 278

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 71

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

ES 2 760 023 T3

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr
145 150 155 160

Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile
165 170 175

Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr
180 185 190

Leu Asn Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu Ile
195 200 205

Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
210 215 220

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
225 230 235 240

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly
245 250 255

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Ser His His His
260 265 270

His His His His His His
275

<210> 72
<211> 1470
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"
<400> 72

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgtccca cgccgctcgg	60
cccagattc agctcgtgca atcgggagcg gaagtcaaga agccaggaga gtccttgctg	120
atctcatgca agggtagcgg ctttaacatc gaggattact acatccactg ggtgaggcag	180
atgccgggga agggactcga atggatggga cggatcgacc cagaaaacga cgaaactaag	240
tacggtccga tcttccaagg ccatgtgact attagcgccg atacttcaat caataccgtg	300
tatctgcaat ggtcctcatt gaaagcctca gataccgcga tgtactactg tgctttcaga	360
ggaggggtct actggggaca gggaactacc gtgactgtct cgtccggcgg aggcgggtca	420
ggaggtggcg gcagcggagg aggaggggtcc ggcggaggtg ggtccgacgt cgtgatgacc	480


```

cagagccctg acagcctggc agtgagcctg ggcgaaagag ctaccattaa ctgcaaatacg      540
tcgcagagcc tgctggactc ggacggaaaa acgtacctca attggctgca gcaaaagcct      600
ggccagccac cgaagcgctt tatctcactg gtgtcgaagc tggattcggg agtgcccgat      660
cgcttctccg gctcgggatc ggttactgac ttcaccctca ctatctctc gcttcaagca      720
gaggacgtgg ccgtctacta ctgctggcag ggaaccactt ttccgggaac cttcggcgga      780
gggacgaaa gggagatcaa gaccactacc ccagcaccga ggccaccac cccggctcct      840
accatcgctt cccagcctct gtccctgcgt ccggaggcat gtagaccgc agctgggtgg      900
gccgtgcata cccggggtct tgacttcgcc tgcgatattt acatttgggc ccctctggct      960
ggtacttgcg gggctcctgct gctttcactc gtgatcactc tttactgtaa gcgcggctcg      1020
aagaagctgc tgtacatctt taagcaacct ttcattgaggc ctgtgcagac tactcaagag      1080
gaggacggct gttcatgccg gttcccagag gaggaggaag gcggctgcga actgcgcgtg      1140
aaattcagcc gcagcgcaga tgctccagcc tacaagcagg ggcagaacca gctctacaac      1200
gaactcaatc ttggctcgag agaggagtac gacgtgctgg acaagcggag aggacgggac      1260
ccagaaatgg gcgggaagcc gcgcagaaag aatccccaag agggcctgta caacgagctc      1320
caaaaggata agatggcaga agcctatagc gagattggtg tgaaagggga acgcagaaga      1380
ggcaaaggcc acgacggact gtaccaggga ctcagcaccg ccaccaagga cacctatgac      1440
gctcttcaca tgcaggccct gccgcctcgg      1470

```

<210> 73

<211> 490

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 73

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

Asn Ile Glu Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys
 50              55              60

```

```

Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys

```

ES 2 760 023 T3

65					70						75					80
Tyr	Gly	Pro	Ile	Phe	Gln	Gly	His	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	
				85					90					95		
Ile	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	
			100					105					110			
Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Phe	Arg	Gly	Gly	Val	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	
		115					120					125				
Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	
	130						135				140					
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Val	Val	Met	Thr	
145					150					155				160		
Gln	Ser	Pro	Asp	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	
				165					170					175		
Asn	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Lys	Thr	Tyr	
			180					185					190			
Leu	Asn	Trp	Leu	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Arg	Leu	Ile	
		195					200					205				
Ser	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Asp	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	
	210					215					220					
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	
225					230					235					240	
Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Trp	Gln	Gly	Thr	His	Phe	Pro	Gly	
				245					250					255		
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	
			260					265						270		
Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	
		275					280					285				
Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	
	290					295					300					
Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	
305					310					315				320		

ES 2 760 023 T3

Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
325 330 335

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
340 345 350

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
355 360 365

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg
370 375 380

Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
385 390 395 400

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

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

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

Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
450 455 460

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

Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485 490

<210> 74
<211> 246
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
<400> 74

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

ES 2 760 023 T3

```

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
    35              40              45

Pro Lys Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
    50              55              60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
    65              70              75              80

Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
              85              90              95

Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
              100              105              110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    115              120              125

Gly Gly Gly Ser Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
    130              135              140

Lys Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn
    145              150              155              160

Ile Glu Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly
              165              170              175

Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys Tyr
              180              185              190

Gly Pro Ile Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Ile
              195              200              205

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala
    210              215              220

Met Tyr Tyr Cys Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
    225              230              235              240

Thr Val Thr Val Ser Ser
              245

```

```

<210> 75
<211> 738
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"
<400> 75

```

ES 2 760 023 T3

gacgtggtga tgaccaaatc gccagattcc ctggcagtgt ccctgggcga acgcgccact 60
 attaactgca aatcgtcaca gtccttgctt gattccgacg gaaagaccta cctcaattgg 120
 ctccagcaga agccaggaca accgccaag agactgatct ccctggtgtc aaagctggac 180
 tcgggagtgc ctgatcgggt ctccggtagc gggagcggca ccgacttcac tctgaccatc 240
 tcgtcactcc aggctgagga cgtggccgtg tattactgtt ggcagggtac tcactttccg 300
 ggcactttcg gaggcggcac caaggtggag attaaaggag gaggcggaag cggaggtgga 360
 ggatcgggag gtggtgggag cggcggagga gggagcgaga tccagctcgt ccaatcggga 420
 gcggaagtga agaagcccg agagtcactt agaattcat gcaaggggtc gggcttcaac 480
 atcgaggatt actacatcca ttgggtccgc cagatgcctg gtaaaggact ggaatggatg 540
 gggaggattg acccgaaaa cgacgaaact aagtacggac cgatctttca agggcacgtg 600
 actatctccg ctgatacctc aatcaatact gtctacctcc agtggctcctc gctgaaagca 660
 agcgacaccg cgatgtacta ctgcgccttc cggggaggag tgtactgggg ccaaggcacc 720
 acggtcacgg tcagctcc 738

<210> 76

<211> 834

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 76

atggccctcc ctgtcacgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg 60
 cccgacgtgg tgatgacca atcgccagat tccctggcag tgtccctggg cgaacgcgcc 120
 actattaact gcaaatcgtc acagtccctt cttgattccg acggaagac ctacctaat 180
 tggctccagc agaagccagg acaaccgcca aagagactga tctccctggt gtcaaagctg 240
 gactcgggag tgcctgatcg gttctcgggt agcgggagcg gcaccgactt cactctgacc 300
 atctcgtcac tccaggctga ggacgtggcc gtgtattact gttggcaggg tactcacttt 360
 ccgggcactt tcggagcgcg caccaagggtg gagattaaag gaggagcgcg aagcggagggt 420
 ggaggatcgg gaggtggtgg gagcggcgga ggaggagcg agatccagct cgtccaatcg 480
 ggagcggaag tgaagaagcc cggagagtca cttagaatct catgcaaggg gtcgggcttc 540
 aacatcgagg attactacat ccattgggtc cgccagatgc ctggtaaagg actggaatgg 600
 atggggagga ttgaccgga aaacgacgaa actaagtacg gaccgatctt tcaagggcac 660
 gtgactatct ccgctgatac ctcaatcaat actgtctacc tccagtgggtc ctcgctgaaa 720
 gcaagcgaca ccgcatgta ctactgcgcc ttccggggag gagtgtactg gggccaaggc 780
 accacggtca cggtcagctc cggctcccat caccaccacc atcaccatca tcac 834

<210> 77

<211> 278

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 77

```

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

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

Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln
          35           40           45

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

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys Leu
65           70           75           80

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

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

Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly Thr
          115          120          125

Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
          130          135          140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser
145          150          155          160

Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys
          165          170          175

```

ES 2 760 023 T3

Gly Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln
180 185 190

Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn
195 200 205

Asp Glu Thr Lys Tyr Gly Pro Ile Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser
210 215 220

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

Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr
245 250 255

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Ser His His His
260 265 270

His His His His His His
275

<210> 78
<211> 1470
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"
<400> 78

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg	60
cccgcagtgg tgatgactca gtcgcctgac tcgctggctg tgtcccttgg agagcgggccc	120
actatcaatt gcaagtcata ccagtcgctg ctggattccg acgggaaaac ctacctcaat	180
tggtgcagc aaaaaccggg acagcctcca aagcggctca tcagcctggt gtccaagttg	240
gacagcggcg tgccagaccg cttctccggt tcgggaagcg gtactgattt cacgctgacc	300
atctcatccc tccaagcgga ggatgtggca gtctactact gttggcaggg cacgcatttt	360
ccgggcactt ttggaggagg gaccaaggtc gaaatcaagg gaggaggtgg ctcgggcgga	420
ggaggctcgg gaggaggagg atcaggaggc ggtggaagcg agattcaact ggtccagagc	480
ggcgcagaag tcaagaagcc ggtggaatcg ctcaaatct cgtgcaaagg atcgggattc	540
aacatcgagg actactacat tcaactgggtc agacaaatgc cgggcaaagg gctggaatgg	600
atggggagga tcgaccccg aaacgatgaa accaagtacg gaccaatctt ccaagggcac	660
gtgaccattt cggcggacac ctcaatcaac actgtgtacc tccagtggag ctacttaag	720

ES 2 760 023 T3

```

gccagcgata ccgcatgta ctattgcgct ttccgaggag ggggtgtactg gggacagggc      780
actactgtga ccgtgtcatc caccactacc ccagcaccga ggccacccac cccggctcct      840
accatcgctt cccagcctct gtccctgcgt cgggagcat gtagaccgc agctgggtgg      900
gccgtgcata cccgggtctt tgacttcgcc tgcgatatct acatttgggc ccctctggct      960
gggtacttgcg gggtcctgct gctttcactc gtgatcactc tttactgtaa gcgcgggtcgg    1020
aagaagctgc tgtacatctt taagcaacctt ttcattgaggc ctgtgcagac tactcaagag    1080
gaggacggct gttcatgccg gttcccagag gaggaggaag gcggctgcga actgcgcgtg     1140
aaattcagcc gcagcgaga tgctccagcc tacaagcagg ggagaaacca gctctacaac     1200
gaactcaatc ttggtcggag agaggagtac gacgtgctgg acaagcggag aggacgggac     1260
ccagaaatgg gcgggaagcc gcgcagaaag aatccccaag agggcctgta caacgagctc     1320
caaaaggata agatggcaga agcctatagc gagattggtg tgaaagggga acgcagaaga     1380
ggcaaaggcc acgacggact gtaccaggga ctcagcaccg ccaccaagga cacctatgac     1440
gctottcaca tgcaggccct gccgcctcgg                                     1470

```

<210> 79

<211> 490

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 79

```

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

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

Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln
35        40        45

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

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys Leu
65        70        75        80

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

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

```


ES 2 760 023 T3

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

ES 2 760 023 T3

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
355 360 365

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg
370 375 380

Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
385 390 395 400

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

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

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

Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
450 455 460

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

Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485 490

<210> 80

<211> 246

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 80

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

ES 2 760 023 T3

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
 130 135 140
 Lys Pro Gly Ala Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn
 145 150 155 160
 Ile Glu Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 165 170 175
 Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys Tyr
 180 185 190
 Gly Pro Ile Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr
 195 200 205
 Asn Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
 210 215 220
 Val Tyr Tyr Cys Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 225 230 235 240
 Thr Val Thr Val Ser Ser
 245

<210> 81
 <211> 738
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"
 <400> 81

gatgtggtca tgacgcagtc accactgtcc ctccccgtga cccttggaca gccagcgtcg 60
 attagctgca agtcatccca atccctgctc gattcggatg gaaagaccta tctcaactgg 120

ES 2 760 023 T3

ctgcagcaaa gacccggtca gagccctagg agactcatct cgttggtgtc aaagctggac	180
agcggagtgc cggaccggtt ttccggttcg ggatcgggga cggacttcac tctgaagatt	240
tcacgggtgg aagctgagga tgtgggagtg tactactgct ggcagggaaac ccatttcctt	300
ggcacttttg gcggaggaac taaggtcgaa atcaaggag gaggtggctc gggaggaggc	360
ggatcgggcg gaggcgggag cggcggagga ggggccgaaa tccaacttgt ccagtcagga	420
gccgaagtga agaaaccggg agccaccgtc aaaatcagct gtaagggtac gggattcaat	480
atcgaggact actacatcca ctgggtgcag caagctccgg gcaaaggact ggagtggatg	540
gggcgcatcg acccagagaa cgacgaaacc aaatacggcc cgatcttcca agggcgggtg	600
accatcaccg cggacacctc aactaacact gtgtacatgg agctgagctc cctgcgctcc	660
gaagatactg cagtctacta ctgcgccttc cgcgggtgtg tgtactgggg acagggcacc	720
actgtgactg tcagctcg	738

<210> 82
 <211> 831
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"
 <400> 82

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgtcca cgcgctcgg	60
cccgatgtgg tcatgacgca gtcaccactg tccctccccg tgacccttgg acagccagcg	120
tcgattagct gcaagtcac ccaatccctg ctcgattcgg atggaaagac ctatctcaac	180
tggctgcagc aaagaccggt tcagagccct aggagactca tctcgttggg gtcaaagctg	240
gacagcggag tgccggaccg gttttccggt tcgggacggg ggacggactt cactctgaag	300
atttcacggg tggaagctga ggatgtggga gtgtactact gctggcaggg aaccatttc	360
cctggcactt ttggcggagg aactaagggtc gaaatcaagg gaggaggtgg ctcgggagga	420
ggcggatcgg gcggaggcgg gagcggcgga ggagggtccg aaatccaact tgtccagtca	480
ggagccgaag tgaagaaacc gggagccacc gtcaaaatca gctgtaaggg atcgggattc	540
aatatcgagg actactacat ccaactgggtg cagcaagctc cgggcaaagg actggagtgg	600
atggggcgca tcgaccaga gaacgacgaa accaaatacg gcccgatctt ccaagggcgg	660
gtgaccatca ccgcggacac ctcaactaac actgtgtaca tggagctgag ctccctgcgc	720
tccgaagata ctgcagtcta ctactgcgc ttccgcggtg gtgtgtactg gggacagggc	780
accactgtga ctgtcagctc ggggtccac catcatcacc accaccatca c	831

<210> 83
 <211> 277
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

ES 2 760 023 T3

<400> 83

```

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

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

Pro Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln
          35          40          45

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

Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys Leu
65          70          75          80

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

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

Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly Thr
          115          120          125

Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
          130          135          140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser
145          150          155          160

Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys
          165          170          175

Gly Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Gln Gln
          180          185          190

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn
          195          200          205

```

ES 2 760 023 T3

Asp Glu Thr Lys Tyr Gly Pro Ile Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr
210 215 220

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

Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr
245 250 255

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Ser His His His
260 265 270

His His His His His
275

<210> 84
<211> 1470
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"
<400> 84

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg	60
cccgatgtgg tcatgacgca gtcaccactg tccctccccg tgacccttgg acagccagcg	120
tcgattagct gcaagtcacg ccaatccctg ctcgattcgg atggaaagac ctatctcaac	180
tggctgcagc aaagaccggg tcagagccct aggagactca tctcgttggg gtcaaagctg	240
gacagcggag tgccggaccg gttttccggg tcgggatcgg ggacggactt cactctgaag	300
atttcacggg tggaagctga ggatgtggga gtgtactact gctggcaggg aacccatttc	360
cctggcactt ttggcggagg aactaaggct gaaatcaagg gaggaggtgg ctccggagga	420
ggcggatcgg gcggaggcgg gagcggcgga ggagggtccg aaatccaact tgtccagtca	480
ggagccgaag tgaagaaacc gggagccacc gtcaaaatca gctgtaaggg atcgggattc	540
aatatcgagg actactacat ccactgggtg cagcaagctc cgggcaaagg actggagtgg	600
atggggcgca tcgaccaga gaacgacgaa accaaatacg gcccgatctt ccaagggcgg	660
gtgaccatca ccgcggacac ctcaactaac actgtgtaca tggagctgag ctccctgcgc	720
tccgaagata ctgcagtcta ctactgcgcc ttccgcggtg gtgtgtactg gggacagggc	780
accactgtga ctgtcagctc gaccactacc ccagcaccga ggccaccac cccggctcct	840
accatgcctt ccagcctct gtccctgcgt ccggaggcat gtagaccgc agctgggtgg	900
gccgtgcata cccggggtct tgacttcgcc tgcgatatct acatttgggc ccctctggct	960

ES 2 760 023 T3

```

gggtacttgcg gggtcctgct gctttcactc gtgatcactc tttactgtaa gcgcgggtcgg      1020
aagaagctgc tgtacatctt taagcaaccc ttcattgaggc ctgtgcagac tactcaagag      1080
gaggacggct gttcatgccg gttcccagag gaggaggaag gcggctgcga actgcgcgtg      1140
aaattcagcc gcagcgcaga tgctccagcc tacaagcagg gccagaacca gctctacaac      1200
gaactcaatc ttggtcggag agaggagtac gacgtgctgg acaagcggag aggacgggac      1260
ccagaaatgg gcgggaagcc gcgcagaaag aatccccaag agggcctgta caacgagctc      1320
caaaaggata agatggcaga agcctatagc gagattggtg tgaaagggga acgcagaaga      1380
ggcaaaggcc acgacggact gtaccaggga ctcagcaccg ccaccaagga cacctatgac      1440
gctcttcaca tgcaggccct gccgcctcgg      1470

```

<210> 85

<211> 490

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 85

```

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

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

Pro Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln
35          40          45

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

Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys Leu
65          70          75          80

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

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

Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly Thr
115         120         125

Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

```

ES 2 760 023 T3

130				135				140							
Gly 145	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly 150	Gly	Gly	Ser	Glu	Ile 155	Gln	Leu	Val	Gln	Ser 160
Gly	Ala	Glu	Val	Lys 165	Lys	Pro	Gly	Ala	Thr 170	Val	Lys	Ile	Ser	Cys 175	Lys
Gly	Ser	Gly	Phe 180	Asn	Ile	Glu	Asp	Tyr 185	Tyr	Ile	His	Trp	Val 190	Gln	Gln
Ala	Pro	Gly 195	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp 200	Met	Gly	Arg	Ile	Asp 205	Pro	Glu	Asn
Asp 210	Glu	Thr	Lys	Tyr	Gly	Pro 215	Ile	Phe	Gln	Gly	Arg 220	Val	Thr	Ile	Thr
Ala 225	Asp	Thr	Ser	Thr	Asn 230	Thr	Val	Tyr	Met	Glu 235	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg 240
Ser	Glu	Asp	Thr	Ala 245	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala 250	Phe	Arg	Gly	Gly	Val 255	Tyr
Trp	Gly	Gln	Gly 260	Thr	Thr	Val	Thr	Val 265	Ser	Ser	Thr	Thr	Thr	Pro 270	Ala
Pro	Arg	Pro 275	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro 280	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln 285	Pro	Leu	Ser
Leu	Arg 290	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg 295	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly 300	Ala	Val	His	Thr
Arg 305	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala 310	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile 315	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala 320
Gly	Thr	Cys	Gly	Val 325	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu 330	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr 335	Cys
Lys	Arg	Gly	Arg 340	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr 345	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro 350	Phe	Met
Arg	Pro	Val 355	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu 360	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser 365	Cys	Arg	Phe
Pro	Glu 370	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly 375	Cys	Glu	Leu	Arg	Val 380	Lys	Phe	Ser	Arg

ES 2 760 023 T3

Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
385 390 395 400

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

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

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

Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
450 455 460

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

Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485 490

<210> 86

<211> 243

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 86

Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Gly Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Thr Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys Tyr Gly Pro Ile Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

ES 2 760 023 T3

Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Pro Gly Thr Thr Leu Thr Val
100 105 110

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser His Met Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Thr Leu Ser Val
130 135 140

Ala Ile Gly Gln Ser Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
145 150 155 160

Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro
165 170 175

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

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
195 200 205

Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys
210 215 220

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
225 230 235 240

Glu Ile Lys

<210> 87
<211> 822
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"
<400> 87

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgcgctcgg	60
cccgagatcc agctccaaca gagcggagcc gaactgggtca aaccgggagc gtcggtgaag	120
ttgtcatgca ctggatcggg cttcaacatc gaggattact acatccactg ggtcaagcaa	180
cgcaccgagc aggggctgga atggatcgga cggatcgacc ccgaaaacga tgaaaccaag	240
tacgggccta tcttccaagg acgggccacc attacggctg acacgtcaag caataccgtc	300
tacctccagc tttccagcct gacctccgag gacactgccg tgtactactg cgccttcaga	360

ES 2 760 023 T3

```

ggaggcgtgt actggggacc aggaaccact ttgaccgtgt ccagcggagg cggtaggatca 420
ggaggaggag gctcaggcgg tggcggctcg cacatggacg tggcatgac tcagtccccg 480
ctgaccctgt cggtaggcaat tggacagagc gcatccatct cgtgcaagag ctcacagtcg 540
ctgctggatt ccgacggaaa gacttatctg aactggctgc tccaaagacc agggcaatca 600
ccgaaacgcc ttatctccct ggtgtcgaaa ctgcactcgg gtgtgccgga tcggtttacc 660
ggtagcgggt ccggcacgga cttcactctc cgcatttcga gggtaggaagc ggaggatctc 720
gggatctact actgttgga ggaaccac ttccctggga cttttggagg cggaactaag 780
ctggaaatca aggtagcca tcaccatcac caccaccatc at 822

```

<210> 88

<211> 274

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 88

```

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

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

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

Asn Ile Glu Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Thr Glu Gln
50          55          60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys
65          70          75          80

Tyr Gly Pro Ile Phe Gln Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser
85          90          95

Ser Asn Thr Val Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr
100         105         110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Pro Gly
115         120         125

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130         135         140

```

ES 2 760 023 T3

Ser Gly Gly Gly Gly Ser His Met Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro
145 150 155 160

Leu Thr Leu Ser Val Ala Ile Gly Gln Ser Ala Ser Ile Ser Cys Lys
165 170 175

Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp
180 185 190

Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Ser Leu Val
195 200 205

Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser
210 215 220

Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu
225 230 235 240

Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly
245 250 255

Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Ser His His His His His His
260 265 270

His His

<210> 89

<211> 1461

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 89

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg	60
cccagatcc agctccaaca gagcggagcc gaactggcca aaccgggagc gtcggtgaag	120
ttgtcatgca ctggatcggg cttcaacatc gaggattact acatccactg ggtcaagcaa	180
cgcaccgagc aggggctgga atggatcgga cggatcgacc ccgaaaacga tgaaccaag	240
tacgggccta tcttccaagg acgggccacc attacggctg acacgtcaag caataccgtc	300
tacctccagc tttccagcct gacctccgag gacactgccg tgtactactg cgccttcaga	360
ggaggcgtgt actggggacc aggaaccact ttgaccgtgt ccagcggagg cggtggatca	420
ggaggaggag gctcaggcgg tggcggctcg cacatggacg tggatcatgac tcagtccccg	480

ES 2 760 023 T3

```

ctgaccctgt cggtaggcaat tggacagagc gcatccatct cgtgcaagag ctcacagtgc      540
ctgctggatt cgcacggaaa gacttatctg aactggctgc tccaaagacc agggcaatca      600
ccgaaacgcc ttatctccct ggtgtogaaa ctogactcgg gtgtgccgga tcggtttacc      660
ggtagcgggt ccggcacgga cttcactctc cgcatttcga gggtaggaagc ggaggatctc      720
gggatctact actgttggca gggaaaccac ttccctggga cttttggagg cggaactaag      780
ctggaaatca agaccactac cccagcaccg aggccacca ccccggtcc taccatcgcc      840
tcccagcctc tgtccctgag tccggaggca tgtagaccgc cagctggtag ggccgtgcat      900
accgggggtc ttgacttcgc ctgcgatatc tacatttggg cccctctggc tggtagttgc      960
ggggctcctgc tgctttcact cgtgatcact ctttactgta agcgcggtcg gaagaagctg     1020
ctgtacatct ttaagcaacc cttcatgagg cctgtgcaga ctactcaaga ggaggacggc     1080
tggtcatgcc ggttcccaga ggaggaggaa ggcggctgcg aactgcgcgt gaaattcagc     1140
cgcagcgcag atgctccagc ctacaagcag ggcagaacc agctctacaa cgaactcaat     1200
cttggtcgga gagaggagta cgacgtgctg gacaagcgga gaggacggga cccagaaatg     1260
ggcgggaagc cgcgcagaaa gaatcccaa gagggcctgt acaacgagct ccaaaggat      1320
aagatggcag aagcctatag cgagattggt atgaaagggg aacgcagaag aggcaaaggc     1380
cacgacggac tgtaccaggg actcagcacc gccaccaagg acacctatga cgctcttcac     1440
atgcaggccc tgccgcctcg g                                     1461

```

<210> 90

<211> 487

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 90

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

Asn Ile Glu Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Thr Glu Gln
 50              55              60

```

ES 2 760 023 T3

Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Glu	Asn	Asp	Glu	Thr	Lys	65	70	75	80
Tyr	Gly	Pro	Ile	Phe	Gln	Gly	Arg	Ala	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	85	90	95	
Ser	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Thr	100	105	110	
Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Phe	Arg	Gly	Gly	Val	Tyr	Trp	Gly	Pro	Gly	115	120	125	
Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	130	135	140	
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	His	Met	Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	145	150	155	160
Leu	Thr	Leu	Ser	Val	Ala	Ile	Gly	Gln	Ser	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Lys	165	170	175	
Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn	Trp	180	185	190	
Leu	Leu	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Arg	Leu	Ile	Ser	Leu	Val	195	200	205	
Ser	Lys	Leu	Asp	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	210	215	220	
Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Arg	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	225	230	235	240
Gly	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Trp	Gln	Gly	Thr	His	Phe	Pro	Gly	Thr	Phe	Gly	245	250	255	
Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	260	265	270	
Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	275	280	285	
Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	290	295	300	
Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	305	310	315	320

ES 2 760 023 T3

Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly
325 330 335

Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val
340 345 350

Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu
355 360 365

Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp
370 375 380

Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn
385 390 395 400

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

Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly
420 425 430

Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu
435 440 445

Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu
450 455 460

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

Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485

<210> 91
<211> 240
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
<400> 91

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asn
20 25 30

ES 2 760 023 T3

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

<210> 92
 <211> 720
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"
 <400> 92

ES 2 760 023 T3

gatatccaaa tgactcagag cccttcatcc ctgagcgcca gcgtcggaga cagggtgacc	60
atcacgtgcc gggcatccca aggcattaga aataacttgg cgtggatatca gcaaaaacca	120
ggaaaggccc cgaagcgct gatctacgcg gcctccaacc ttcagtcagg agtgccctcg	180
cgttcaccg ggagcggtag cggaactgag tttaccctta tcgtgtcgtc cctgcagcca	240
gaggacttcg cgacctacta ctgcctccag catcactcgt acccgttgac ttcgggaggc	300
ggaaccaagg tcgaaatcaa acgcactggc tcgacgtcag ggtccggtaa accgggatcg	360
ggagaaggat cggaagtcca agtgctggag agcggaggcg gactcgtgca acctggcggg	420
tcgtcgcgc tcagctgtgc cgcgtcgggt tttactttca gctcgtacgc tatgtcatgg	480
gtcgggcagg ctccgggaaa ggggctggaa tgggtgtccg ctatttcggg ctcgggtgga	540
agcaccaatt acgccgactc cgtgaaggga cgcttcacca tctcacggga taactccaag	600
aatactctgt acctccagat gaactcgtg agagccgagg acaccgcagt gtactactgc	660
gcagggtcaa gcggctggtc cgaatactgg ggacagggca ccctcgtcac tgtcagctcc	720

<210> 93
 <211> 807
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"
 <400> 93

atggccctcc ctgtcacgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgcgctcgg	60
cccgatatcc aaatgactca gagcccttca tccctgagcg ccagcgtcgg agacagggtg	120
accatcacgt gccgggcatc ccaaggcatt agaaataact tggcgtggta tcagcaaaaa	180
ccaggaaagg ccccggaagc cctgatctac gcggcctcca accttcagtc aggagtgcc	240
tcgcgcttca ccgggagcgg tagcggaaact gagtttacc ttatcgtgtc gtccctgcag	300
ccagaggact tcgcgacct ctactgcctc cagcatcact cgtaccggtt gacttcggga	360
ggcggaacca aggtcgaaat caaacgcact ggctcgacgt cagggtccgg taaaccggga	420
tcgggagaag gatcggaagt ccaagtgtg gagagcggag gcggactcgt gcaacctggc	480
gggtcgtgc ggctcagctg tgccgcgtcg ggttttactt tcagctcgta cgctatgtca	540
tgggtgcggc aggctccgg aaaggggtg gaatgggtgt ccgctatttc cggctcgggt	600
ggaagcacca attacccga ctccgtgaag ggacgcttca ccctctcac ggataactcc	660
aagaatactc tgtacctcca gatgaactcg ctgagagccg aggacaccgc agtgtactac	720
tgcgcagggt caagcggtg gtccgaatac tggggacagg gcaccctcgt cactgtcagc	780
tcccatcacc atcaccacca ccatac	807

<210> 94
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

ES 2 760 023 T3

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 94

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

ES 2 760 023 T3

195

200

205

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
210 215 220

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

Cys Ala Gly Ser Ser Gly Trp Ser Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
245 250 255

Val Thr Val Ser Ser His His His His His His His His
260 265

<210> 95

<211> 1452

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 95

```

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg      60
cccgatatcc aaatgactca gagcccttca tccctgagcg ccagcgctcg agacaggggtg      120
accatcacgt gccgggcatc ccaaggcatt agaaataact tggcgtggta tcagcaaaaa      180
ccaggaaagg ccccggaagcg cctgatctac ggggcctcca accttcagtc aggagtgtccc      240
tcgcgcttca ccgggagcgg tagcgggaact gagtttacct ttatcgtgtc gtccctgcag      300
ccagaggact tcgcgacctc ctactgcctc cagcatcact cgtaccggtt gacttcggga      360
ggcggaacca aggtcgaaat caaacgcact ggctcgacgt cagggtccgg taaaccggga      420
tcgggagaag gatcggaagt ccaagtgtg gagagcggag gcggactcgt gcaacctggc      480
gggtcgctgc ggctcagctg tgccgcgtcg ggttttactt tcagctcgta cgctatgtca      540
tgggtgcggc aggctccggg aaaggggctg gaatgggtgt ccgctatttc cggctcgggt      600
ggaagcacca attacgccga ctccgtgaag ggacgcttca ccatctcacg ggataactcc      660
aagaatactc tgtacctcca gatgaactcg ctgagagccg aggacaccgc agtgtactac      720
tgcgcagggt caagcggtg gtccgaatac tggggacagg gcaccctcgt cactgtcagc      780
tccaccacta ccccgaccaggaggccacc acccggctc ctaccatcgc ctcccagcct      840
ctgtccctgc gtccggaggc atgtagacct gcagctggtg gggccgtgca taccgggggt      900
cttgacttcg cctgcgatat ctacatttgg gccctctggt ctggtacttg cggggtcctg      960
ctgctttcac tcgtgatcac tctttactgt aagcgcggtc ggaagaagct gctgtacatc     1020

```

ES 2 760 023 T3

```

ttaaagcaac ccttcatgag gcctgtgcag actactcaag aggaggacgg ctgttcatgc      1080
cggttcccag aggaggagga aggcggctgc gaactgcgcg tgaaattcag ccgcagcgca      1140
gatgctccag cctacaagca ggggcagaac cagctctaca acgaactcaa tcttggtcgg      1200
agagaggagt acgacgtgct ggacaagcgg agaggacggg acccagaaat gggcgggaag      1260
ccgcgcagaa agaatcccca agagggcctg tacaacgagc tccaaaagga taagatggca      1320
gaagcctata gcgagattgg tatgaaaggg gaacgcagaa gaggcaaagg ccacgacgga      1380
ctgtaccagg gactcagcac cgccaccaag gacacctatg acgctcttca catgcaggcc      1440
ctgccgcctc gg                                                                1452

```

<210> 96

<211> 484

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 96

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

Gly Ile Arg Asn Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
50           55           60

```

```

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro
65           70           75           80

```

```

Ser Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Ile Val
          85           90           95

```

```

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His
          100           105           110

```

```

His Ser Tyr Pro Leu Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          115           120           125

```

```

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

```

ES 2 760 023 T3

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

385		390		395		400									
Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu
				405					410					415	
Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn
			420					425					430		
Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met
		435					440					445			
Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly
	450					455					460				
Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala
465					470					475					480

Leu Pro Pro Arg

<210> 97
 <211> 1183
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"
 <400> 97

gtgaggctcc ggtgcccgtc agtgggcaga gcgcacatcg cccacagtcc ccgagaagtt	60
ggggggaggg gtcggcaatt gaaccggtgc ctagagaagg tggcgcgggg taaactggga	120
aagtgatgtc gtgtactggc tccgcctttt tcccgagggt gggggagaaac cgtatataag	180
tgcagtagtc gccgtgaacg ttcttttttcg caacgggttt gccgccagaa cacaggtaag	240
tgccgtgtgt gggtcccgcg ggcttggcct ctttacgggt tatggccctt gcgtgccttg	300
aattacttcc acctggctgc agtacgtgat tcttgatccc gagcttcggg ttggaagtgg	360
gtgggagagt tgcaggcctt gcgcttaagg agccccttcg cctcgtgctt gagttgaggc	420
ctggcctggg cgctggggcc gccgcgtgcg aatctgggtg caccttcgcg cctgtctcgc	480
tgcttttcgat aagtctctag ccatttaaaa tttttgatga cctgctgcga cgtttttttt	540
ctggcaagat agtcttgtaa atgcggggcca agatctgcac actggtatatt cggttttttg	600
ggccgcgggc ggcgacgggg cccgtgcgtc ccagcgaca tggtcggcga ggcggggcct	660
gcgagcgcg ccaccgagaa tcggacgggg gtagtctcaa gctggccggc ctgctctggt	720
gcctggcctc gcgccgccgt gtatcgcccc gccctgggcg gcaaggctgg cccggtcggc	780

ES 2 760 023 T3

```

accagttgcg tgagcggaaa gatggccgct tcccggccct gctgcaggga gctcaaaatg      840
gaggacgcgg cgctcgggag agcgggaggg tgagtcaccc acacaaagga aaagggcctt      900
tccgtcctca gccgtcgtt catgtgactc cacggagtac cgggcgcgtt ccaggcacct      960
cgattagttc tcgagctttt ggagtacgtc gtcttttaggt tggggggagg ggttttatgc     1020
gatggagttt cccacactg agtgggtgga gactgaagtt aggccagctt ggcacttgat     1080
gtaattctcc ttggaatttg ccctttttga gtttgatct tggttcattc tcaagcctca     1140
gacagtgggtt caaagttttt ttcttcatt tcaggtgtcg tga                        1183

```

<210> 98
 <211> 729
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"
 <400> 98

```

gagatccagc tccaacagag cggagccgaa ctggtcaaac cgggagcgtc ggtgaagttg      60
tcatgcactg gatcgggctt caacatcgag gattactaca tccactgggt caagcaacgc      120
accgagcagg ggctggaatg gatcggacgg atcgaccccg aaaacgatga aaccaagtac      180
gggcctatct tccaaggacg ggccaccatt acggctgaca cgtcaagcaa taccgtctac      240
ctccagcttt ccagcctgac ctccgaggac actgccgtgt actactgcgc cttcagagga      300
ggcgtgtact ggggaccagg aaccactttg accgtgtcca gcggaggcgg tggatcagga      360
ggaggaggct caggcggtgg cggctgcac atggacgtgg tcatgactca gtccccgctg      420
accctgtcgg tggcaattgg acagagcgca tccatctcgt gcaagagctc acagtcgctg      480
ctggattccg acggaagac ttatctgaac tggctgctcc aaagaccagg gcaatcaccg      540
aaacgcctta tctccctggt gtcgaaactc gactcgggtg tgccggatcg gtttaccggt      600
agcgggtccg gcacggactt cactctccgc atttcgaggg tggaagcgga ggatctcggg      660
atctactact gttggcaggg aaccacttc cctgggactt ttggaggcgg aactaagctg      720
gaaatcaag                                           729

```

<210> 99
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 99

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

ES 2 760 023 T3

Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr
			20					25					30		
Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys
		35					40					45			
Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys
	50					55					60				
Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg
65					70					75				80	
Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala
				85					90					95	
Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg
			100					105					110		

<210> 100
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 100

agagtgaagt tcagcaggag cgagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc	60
tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg ttttggacaa gagacgtggc	120
cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctgaggaagg cctgtacaat	180
gaactgcaga aagataagat ggcgagggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc	240
cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggctctca gtacagccac caaggacacc	300
tacgacgccc ttcacatgca ggccctgccc cctcgc	336

<210> 101
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 <400> 101

Leu	Glu	Glu	Lys	Lys	Gly	Asn	Tyr	Val	Val	Thr	Asp	His	Cys
1				5					10				

<210> 102
 <211> 48
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 102

ES 2 760 023 T3

Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu Pro
1 5 10 15

Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser Thr
20 25 30

Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser Pro
35 40 45

<210> 103

<211> 123

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 103

aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc ccgccgcccc 60

gggccacccc gcaagcatta ccagccctat gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc 120

tcc 123

<210> 104

<211> 230

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 104

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
1 5 10 15

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
35 40 45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
50 55 60

ES 2 760 023 T3

Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	
65					70					75					80	
Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	
			85						90					95		
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	
		100						105					110			
Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	
		115					120					125				
Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	
	130						135				140					
Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	
145					150					155					160	
Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	
				165					170					175		
Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	
			180					185					190			
Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	
		195					200					205				
Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	
	210					215					220					
Leu	Ser	Leu	Gly	Lys	Met											
225					230											

<210> 105
 <211> 690
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"
 <400> 105

gagagcaagt acggccctcc ctgccccct tgcctgccc ccgagttcct gggcggaccc	60
agcgtgttcc tgttcccccc caagcccaag gacaccctga tgatcagccg gacccccgag	120
gtgacctgtg tgggtggtgga cgtgtcccag gaggaccccg aggtccagtt caactggtac	180
gtggacggcg tggaggtgca caacgccaag accaagcccc gggaggagca gttcaatagc	240

ES 2 760 023 T3

```

acctaccggg tgggtgccgt gctgaccgtg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggaa      300
tacaagtgta aggtgtccaa caagggcctg cccagcagca tcgagaaaac catcagcaag      360
gccaaagggcc agcctcggga gccccagggtg tacaccctgc cccctagcca agaggagatg      420
accaagaacc aggtgtccct gacctgcctg gtgaagggtt tctaccccag cgacatcgcc      480
gtggagtggg agagcaacgg ccagcccagag aacaactaca agaccacccc ccctgtgctg      540
gacagcgacg gcagcttctt cctgtacagc cggctgaccg tggacaagag ccggtggcag      600
gagggcaacg tcttttagctg ctccgtgatg cacgaggccc tgcacaacca ctacaccag      660
aagagcctga gcctgtccct gggcaagatg                                     690

```

<210> 106

<211> 282

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 106

```

Arg Trp Pro Glu Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro Thr Ala
1          5          10          15

Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala
          20          25          30

Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys
          35          40          45

Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro
50          55          60

Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Tyr Leu Leu Thr Pro Ala Val Gln
65          70          75          80

Asp Leu Trp Leu Arg Asp Lys Ala Thr Phe Thr Cys Phe Val Val Gly
          85          90          95

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

Pro Thr Gly Gly Val Glu Glu Gly Leu Leu Glu Arg His Ser Asn Gly
          115          120          125

Ser Gln Ser Gln His Ser Arg Leu Thr Leu Pro Arg Ser Leu Trp Asn
130          135          140

```

ES 2 760 023 T3

Ala Gly Thr Ser Val Thr Cys Thr Leu Asn His Pro Ser Leu Pro Pro
145 150 155 160

Gln Arg Leu Met Ala Leu Arg Glu Pro Ala Ala Gln Ala Pro Val Lys
165 170 175

Leu Ser Leu Asn Leu Leu Ala Ser Ser Asp Pro Pro Glu Ala Ala Ser
180 185 190

Trp Leu Leu Cys Glu Val Ser Gly Phe Ser Pro Pro Asn Ile Leu Leu
195 200 205

Met Trp Leu Glu Asp Gln Arg Glu Val Asn Thr Ser Gly Phe Ala Pro
210 215 220

Ala Arg Pro Pro Pro Gln Pro Gly Ser Thr Thr Phe Trp Ala Trp Ser
225 230 235 240

Val Leu Arg Val Pro Ala Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala Thr Tyr Thr
245 250 255

Cys Val Val Ser His Glu Asp Ser Arg Thr Leu Leu Asn Ala Ser Arg
260 265 270

Ser Leu Glu Val Ser Tyr Val Thr Asp His
275 280

<210> 107

<211> 847

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 107

```
aggtggcccg aaagtcccaa gggccaggca tctagtgttc ctactgcaca gcccaggca      60
gaaggcagcc tagccaaagc tactactgca cctgccacta cgcgcaatac tggccgtggc     120
ggggaggaga agaaaaagga gaaagagaaa gaagaacagg aagagagggg gaccaagacc     180
cctgaatgtc catcccatat ccagccgctg ggcgtctatc tcttgactcc cgcagtacag     240
gacttggtggc ttagagataa ggccaccttt acatgtttcg tcgtggggtc tgacctgaag     300
gatgcccatt tgacttgga ggttgccgga aaggtaccca cagggggggg tgaggaaggg     360
ttgctggagc gccattccaa tggctctcag agccagcact caagactcac ccttccgaga     420
```

```
tccctgtgga acgccgggac ctctgtcaca tgtactctaa atcatcctag cctgccccca 480
cagcgtctga tggcccttag agagccagcc gccagggcac cagttaagct tagcctgaat 540
ctgctcgcca gtagtgatcc ccagaggcc gccagctggc tcttatgcga agtgtccggc 600
tttagccgc ccaacatctt gctcatgtgg ctggaggacc agcgagaagt gaacaccagc 660
ggcttcgctc cagcccgcc cccaccccag ccgggttcta ccacattctg ggcctggagt 720
gtcttaaggg tccagcacc acctagcccc cagccagcca catacacctg tgttgtgtcc 780
catgaagata gcaggaccct gctaaatgct tctaggagtc tggaggttcc ctacgtgact 840
gaccatt 847
```

```
<210> 108
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
<400> 108
```

```
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10
```

```
<210> 109
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"
<400> 109
ggtggcggag gttctggagg tggaggttcc 30
<210> 110
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
<220>
<221> característica miscelánea
<222> (1)..(30)
<223> /nota=»Esta secuencia puede abarcar 1, 2, 3, 4, 5 o 6 unidades repetitivas 'Gly
Gly Gly Gly Ser'"
<220>
<221> VARIANTE
<222> (6)..(30)
<223> /reemplazar=" "
<220>
<221> característica miscelánea
<222> (1)..(30)
<223> /nota=»Residuos variantes dados en la secuencia no tienen preferencia con
respecto a los de las anotaciones para posiciones variantes"
<220>
<221> característica miscelánea
```

<222> (1)..(30)

<223> /nota="Véase la memoria descriptiva tal como ha sido presentada para una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas"

<400> 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25 30

<210> 111

<211> 150

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 111

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 120

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 150

<210> 112

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 112

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 113

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 113

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 114

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
<400> 114

Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
1				5					10					15

<210> 115
<211> 5000
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"
<220>
<221> característica miscelánea
<222> (1)..(5000)
<223> /nota="Esta secuencia puede abarcar entre 50 y 5.000 nucleótidos"
<220>
<221> variación
<222> (51)..(5000)
<223> /reemplazar=" "
<220>
<221> característica miscelánea
<222> (1)..(5000)
<223> /nota="Bases variantes dadas en la secuencia no tienen preferencia con respecto a las de las anotaciones para posiciones variantes"
<220>
<221> característica miscelánea
<222> (1)..(5000)
<223> /nota="Véase la memoria descriptiva tal como ha sido presentada para una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas"
<400> 115

ES 2 760 023 T3

[illegible]

ES 2 760 023 T3

[illegible]

ES 2 760 023 T3

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3720
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3780
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3840
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3900
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3960
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4020
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4080
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4140
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4200
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4260
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4320
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4380
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4440
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4500
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4560
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4620
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4680
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4740
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4800
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4860
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4920
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4980
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa	5000

<210> 116
 <211> 2000
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (1)..(2000)
 <223> /nota="Esta secuencia puede abarcar entre 50 y 2.000 nucleótidos"
 <220>
 <221> variación
 <222> (51)..(2000)
 <223> /reemplazar=" "
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (1)..(2000)
 <223> /nota="Bases variantes dadas en la secuencia no tienen preferencia con respecto a las de las anotaciones para posiciones variantes"

ES 2 760 023 T3

<400> 116

[illegible]

<210> 117
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"
 <400> 117

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	60
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	100

<210> 118
 <211> 5000
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"
 <220>

<221> característica miscelánea
 <222> (1)..(5000)
 <223> /nota="Esta secuencia puede abarcar entre 50 y 5.000 nucleótidos"
 <220>

<221> variación
 <222> (51)..(5000)
 <223> /reemplazar=" "
 <220>

<221> característica miscelánea
 <222> (1)..(5000)
 <223> /nota="Bases variantes dadas en la secuencia no tienen preferencia con respecto a las de las anotaciones para posiciones variantes"
 <400> 118

ES 2 760 023 T3

[illegible]

ES 2 760 023 T3

t	t	t	t	t	t	1860
t	t	t	t	t	t	1920
t	t	t	t	t	t	1980
t	t	t	t	t	t	2040
t	t	t	t	t	t	2100
t	t	t	t	t	t	2160
t	t	t	t	t	t	2220
t	t	t	t	t	t	2280
t	t	t	t	t	t	2340
t	t	t	t	t	t	2400
t	t	t	t	t	t	2460
t	t	t	t	t	t	2520
t	t	t	t	t	t	2580
t	t	t	t	t	t	2640
t	t	t	t	t	t	2700
t	t	t	t	t	t	2760
t	t	t	t	t	t	2820
t	t	t	t	t	t	2880
t	t	t	t	t	t	2940
t	t	t	t	t	t	3000
t	t	t	t	t	t	3060
t	t	t	t	t	t	3120
t	t	t	t	t	t	3180
t	t	t	t	t	t	3240
t	t	t	t	t	t	3300
t	t	t	t	t	t	3360
t	t	t	t	t	t	3420
t	t	t	t	t	t	3480
t	t	t	t	t	t	3540
t	t	t	t	t	t	3600
t	t	t	t	t	t	3660
t	t	t	t	t	t	3720

ES 2 760 023 T3

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	3780
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	3840
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	3900
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	3960
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4020
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4080
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4140
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4200
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4260
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4320
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4380
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4440
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4500
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4560
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4620
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4680
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4740
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4800
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4860
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4920
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4980
tttttttttt tttttttttt	5000

<210> 119
 <211> 5000
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (1)..(5000)
 <223> /nota="Esta secuencia puede abarcar entre 100 y 5.000 nucleótidos"
 <220>
 <221> variación
 <222> (101)..(5000)
 <223> /reemplazar=" "
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (1)..(5000)
 <223> /nota="Bases variantes dadas en la secuencia no tienen preferencia con respecto a las de las anotaciones para posiciones variantes"
 <400> 119

ES 2 760 023 T3

aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	60
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	120
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	180
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	240
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	300
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	360
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	420
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	480
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	540
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	600
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	660
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	720
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	780
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	840
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	900
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	960
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1020
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1080
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1140
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1200
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1260
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1320
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1380
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1440
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1500

ES 2 760 023 T3

[illegible]

ES 2 760 023 T3

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3480
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3540
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3600
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3660
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3720
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3780
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3840
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3900
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3960
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4020
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4080
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4140
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4200
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4260
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4320
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4380
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4440
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4500
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4560
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4620
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4680
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4740
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4800
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4860
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4920
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4980
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa	5000

<210> 120

<211> 400

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (1)..(400)

<223> /nota="Esta secuencia puede abarcar entre 100 y 400 nucleótidos"

<220>

<221> variación

<222> (101)..(400)
 <223> /reemplazar=" "
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (1)..(400)
 <223> /nota="Bases variantes dadas en la secuencia no tienen preferencia con respecto a las de las anotaciones para posiciones variantes"
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (1)..(400)
 <223> /nota="Véase la memoria descriptiva tal como ha sido presentada para una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas"
 <400> 120

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	60
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	120
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	180
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	240
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	300
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	360
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	400

<210> 121
 <211> 487
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 121

Met Val Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro	
1 5 10 15	
Ala Phe Leu Ile Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser	
20 25 30	

ES 2 760 023 T3

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

ES 2 760 023 T3

Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu
 290 295 300
 Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys
 305 310 315 320
 Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly
 325 330 335
 Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val
 340 345 350
 Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu
 355 360 365
 Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp
 370 375 380
 Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn
 385 390 395 400
 Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg
 405 410 415
 Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly
 420 425 430
 Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu
 435 440 445
 Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu
 450 455 460
 Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His
 465 470 475 480
 Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485

<210> 122

<211> 114

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 122

Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

ES 2 760 023 T3

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Gly Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Thr Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys Tyr Gly Pro Ile Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Pro Gly Thr Thr Leu Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 123
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
<400> 123

Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys Tyr Gly Pro Ile Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 124
<211> 114
<212> PRT

ES 2 760 023 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 124

Glu	Ile	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu	1	5	10	15
Ser	Leu	Arg	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Glu	Asp	Tyr	20	25	30	
Tyr	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	35	40	45	
Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Glu	Asn	Asp	Glu	Thr	Lys	Tyr	Gly	Pro	Ile	Phe	50	55	60	
Gln	Gly	His	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Ile	Asn	Thr	Val	Tyr	65	70	75	80
Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Phe	Arg	Gly	Gly	Val	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	100	105	110	
Ser	Ser																		

<210> 125

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 125

Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Thr	Leu	Ser	Val	Ala	Ile	Gly	1	5	10	15
Gln	Ser	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Asp	Ser	20	25	30	
Asp	Gly	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn	Trp	Leu	Leu	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser	35	40	45	
Pro	Lys	Arg	Leu	Ile	Ser	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Asp	Ser	Gly	Val	Pro	50	55	60	
Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Arg	Ile	65	70	75	80
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Trp	Gln	Gly	85	90	95	
Thr	His	Phe	Pro	Gly	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	100	105	110	

ES 2 760 023 T3

<210> 126
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 126

Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Leu	Gly
1				5					10					15	
Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Asp	Ser
			20					25					30		
Asp	Gly	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn	Trp	Leu	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			
Pro	Arg	Arg	Leu	Ile	Ser	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Asp	Ser	Gly	Val	Pro
	50					55					60				
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65					70					75				80	
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Trp	Gln	Gly
				85					90					95	
Thr	His	Phe	Pro	Gly	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
			100					105					110		

<210> 127
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 127

ES 2 760 023 T3

Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	1	5	10	15
Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Asp	Ser	20	25	30	
Asp	Gly	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn	Trp	Leu	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	35	40	45	
Pro	Lys	Arg	Leu	Ile	Ser	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Asp	Ser	Gly	Val	Pro	50	55	60	
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	65	70	75	80
Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Trp	Gln	Gly	85	90	95	
Thr	His	Phe	Pro	Gly	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	100	105	110	

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde dicho CAR comprende un dominio de unión anti-EGFRvIII, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio de señalización primario, un dominio co-estimulante, o tanto un dominio de señalización primario como un dominio co-estimulante, en donde el dominio de unión anti-EGFRvIII codificado comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 99% de identidad de la secuencia con SEQ ID NO: 68 que comprende:
- (a) una región variable de inmunoglobulina de cadena pesada que comprende:
- (i) una CDR1 que comprende la secuencia DYYIH (SEQ ID NO: 22);
- (ii) una CDR2 que comprende la secuencia RIDPENDETKYGPIFQG (SEQ ID NO: 23); y
- (iii) una CDR3 que comprende la secuencia RGGVY (SEQ ID NO: 24); y
- (b) una región variable de inmunoglobulina de cadena ligera que comprende:
- (i) una CDR1 que comprende la secuencia KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO: 26);
- (ii) una CDR2 que comprende la secuencia LVSKLDS (SEQ ID NO: 27); y
- (iii) una CDR3 que comprende la secuencia WQGTHFPGT (SEQ ID NO: 28).
2. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1, en donde:
- (i) el dominio de unión anti-EGFRvIII codificado comprende la secuencia de SEQ ID NO: 68;
- (ii) la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el dominio de unión anti-EGFRvIII comprende una secuencia de nucleótidos con al menos un 99% de identidad de la secuencia con SEQ ID NO: 69;
- (iii) la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el dominio de unión anti-EGFRvIII comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 69;
- (iv) el CAR codificado comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 99% de identidad de la misma; y/o
- (v) la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el CAR comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 72 o una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos un 99% de identidad de la misma.
3. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1 o 2, en donde:
- (i) el CAR codificado comprende un dominio transmembrana que comprende un dominio transmembrana de una proteína seleccionada del grupo que consiste en la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 y CD154;
- (ii) el dominio transmembrana codificado comprende la secuencia de SEQ ID NO: 15, una secuencia de aminoácidos que comprende al menos una modificación, pero no más de 20 modificaciones de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 o una secuencia con al menos un 95% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, y/o
- (iii) la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el dominio transmembrana comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8 o una secuencia con al menos un 95% de identidad con la misma.
4. La molécula de ácido nucleico aislada de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el dominio de unión anti-EGFRvIII codificado está conectado al dominio transmembrana mediante una región de bisagra, opcionalmente en donde ya sea:
- (i) la región de bisagra codificada comprende SEQ ID NO: 14, o una secuencia con al menos un 95% de identidad con la misma; o
- (ii) la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la región de bisagra comprende la secuencia de SEQ ID NO: 7, o una secuencia con al menos un 95% de identidad con la misma.
5. La molécula de ácido nucleico aislada de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el dominio de señalización intracelular codificado comprende un dominio de señalización primario y un dominio co-estimulante, p. ej., el dominio de

señalización funcional de una proteína seleccionada del grupo que consiste en OX40, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) y 4-1BB (CD137), opcionalmente, en donde

(i) el dominio co-estimulante codificado comprende la secuencia de SEQ ID NO: 16; una secuencia de aminoácidos que comprende al menos una modificación, pero no más de 20 modificaciones de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, o una secuencia con al menos un 95% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; o

(ii) la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el dominio co-estimulante comprende la secuencia de SEQ ID NO: 9 o una secuencia con al menos un 95% de identidad con la misma.

6. La molécula de ácido nucleico aislada de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde:

(i) el dominio de señalización intracelular codificado comprende un dominio de señalización primario;

(ii) el dominio de señalización intracelular codificado comprende un dominio de señalización co-estimulante;

(iii) el dominio de señalización intracelular codificado comprende un dominio de señalización funcional de 4-1BB y un dominio de señalización funcional de CD3 zeta;

(iv) el dominio co-estimulante codificado comprende la secuencia de SEQ ID NO: 16; una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una modificación, pero no más de 20 modificaciones de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, o una secuencia con al menos un 95% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; y el dominio de señalización primario codificado comprende la secuencia de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 99; una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una modificación, pero no más de 20 modificaciones de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 99 o una secuencia con al menos un 95% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 99;

(iv) el dominio de señalización intracelular codificado comprende la secuencia de SEQ ID NO: 16 y la secuencia de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 99, en donde las secuencias que comprenden el dominio de señalización intracelular se expresan en el mismo marco y como una cadena polipeptídica única; y/o

(v) la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el dominio de señalización intracelular comprende la secuencia de SEQ ID NO: 9 o una secuencia con al menos un 95% de identidad con la misma, y/o la secuencia de SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 100, o una secuencia con al menos un 95% de identidad con la misma.

7. La molécula de ácido nucleico aislada de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende, además, una secuencia conductora, opcionalmente, en donde la secuencia conductora comprende SEQ ID NO: 13.

8. Una molécula de CAR aislada, codificada por la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

9. La molécula de CAR aislada de la reivindicación 8, que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 73, o una secuencia con un 99% de identidad con la misma.

10. Una molécula de receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde dicha molécula de CAR comprende un dominio de unión anti-EGFRvIII, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio de señalización primario, un dominio co-estimulante, o tanto un dominio de señalización primario como un dominio co-estimulante, en donde el dominio de unión anti-EGFRvIII codificado comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 99% de identidad de la secuencia con SEQ ID NO: 68, que comprende:

(a) una región variable de inmunoglobulina de cadena pesada que comprende:

(i) una CDR1 que comprende la secuencia DYYH (SEQ ID NO: 22);

(ii) una CDR2 que comprende la secuencia RIDPENDETKYGPIFQG (SEQ ID NO: 23); y

(iii) una CDR3 que comprende la secuencia RGGVY (SEQ ID NO: 24); y

(b) una región variable de inmunoglobulina de cadena ligera que comprende:

(i) una CDR1 que comprende la secuencia KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO: 26);

(ii) una CDR2 que comprende la secuencia LVSKLDS (SEQ ID NO: 27); y

(iii) una CDR3 que comprende la secuencia WQGTHFPGT (SEQ ID NO: 28).

11. La molécula de CAR de la reivindicación 10, en donde dicho CAR es un CAR según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 2-9.
12. Un vector, que comprende una molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
13. El vector de la reivindicación 12, en donde:
- (i) el vector se selecciona del grupo que consiste en un ADN, un ARN, un plásmido, un vector lentivirus, un vector adenoviral y un vector retrovirus.
 - (ii) el vector comprende, además, un promotor, p. ej., un promotor EF-1, tal como un promotor EF-1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 97;
 - (iii) el vector es un vector transcrito in vitro;
 - (iv) la secuencia de ácidos nucleicos en el vector comprende, además, una cola poli(A); y/o
 - (v) la secuencia de ácidos nucleicos en el vector comprende, además, una 3'UTR.
14. Una célula aislada, que comprende la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, la molécula de polipéptido aislado de las reivindicaciones 8-9, el CAR de las reivindicaciones 10-11 o el vector de las reivindicaciones 12-13, opcionalmente, en donde
- (i) la célula es una célula T, p. ej., una célula T CD8+; y/o
 - (ii) la célula es una célula humana.
15. Un método in vitro o ex vivo de:
- (i) producir una célula, que comprende transducir una célula T con la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o el vector de las reivindicaciones 12 o 13; o
 - (ii) generar una población de células modificadas en el ARN, que comprende introducir un ARN transcrito in vitro o ARN sintético en una célula, en que el ARN comprende la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
16. Una célula de la reivindicación 14 para uso en un método de proporcionar una inmunidad anti-tumor en un mamífero, comprendiendo dicho método administrar al mamífero una cantidad efectiva de la célula.
17. Una célula de la reivindicación 14 para uso en un método de tratar un mamífero que tiene una enfermedad asociada con la expresión de EGFRvIII, comprendiendo dicho método administrar al mamífero una cantidad efectiva de la célula, opcionalmente, en donde la enfermedad asociada con la expresión de EGFRvIII es un cáncer, seleccionado del grupo que consiste en glioblastoma multiforme (GBM), astrocitoma anaplásico, glioblastoma de células gigantes, gliosarcoma, oligodendroglioma anaplásico, ependimoma anaplásico, carcinoma del plexo coroideo, ganglioglioma anaplásico, pineoblastoma, meduloepitelioma, ependimoblastoma, meduloblastoma, tumor neuroectodérmico primitivo supratentorial, tumor teratoideo/rabdoideo atípico, cáncer de pulmón (p. ej., carcinomas de pulmón de células no pequeñas), de mama, próstata, ovario, carcinoma colorrectal y de vejiga y cualquier combinación de los mismos, y metástasis de cualquiera de los cánceres.
18. La molécula de ácido nucleico aislada de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, la molécula de polipéptido aislado de las reivindicaciones 8-9, el CAR de las reivindicaciones 10-11, el vector de las reivindicaciones 12-13 o la célula de la reivindicación 14, para uso como un medicamento.

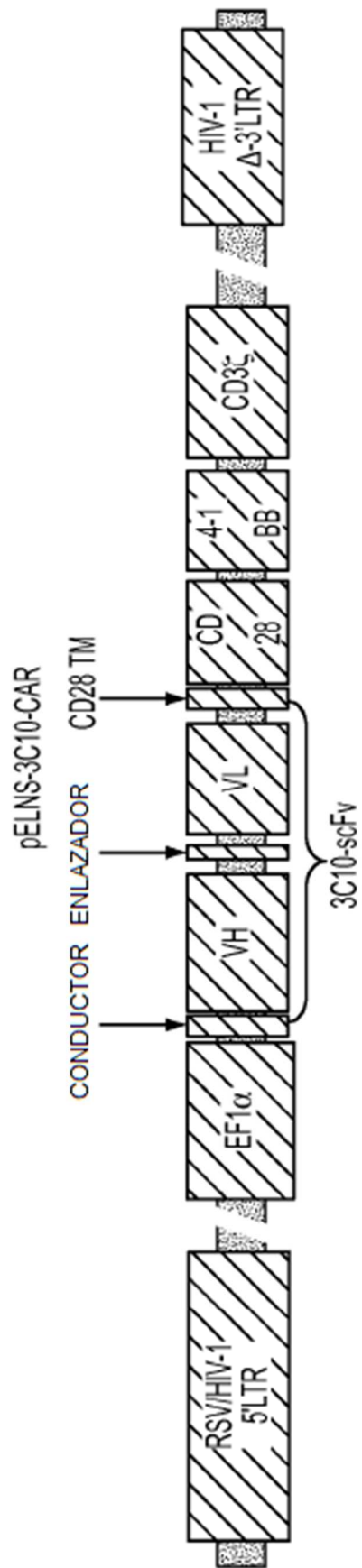


FIG. 1A

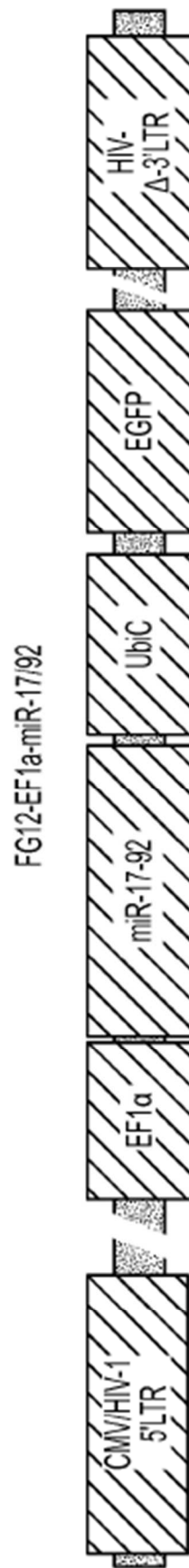


FIG. 1B

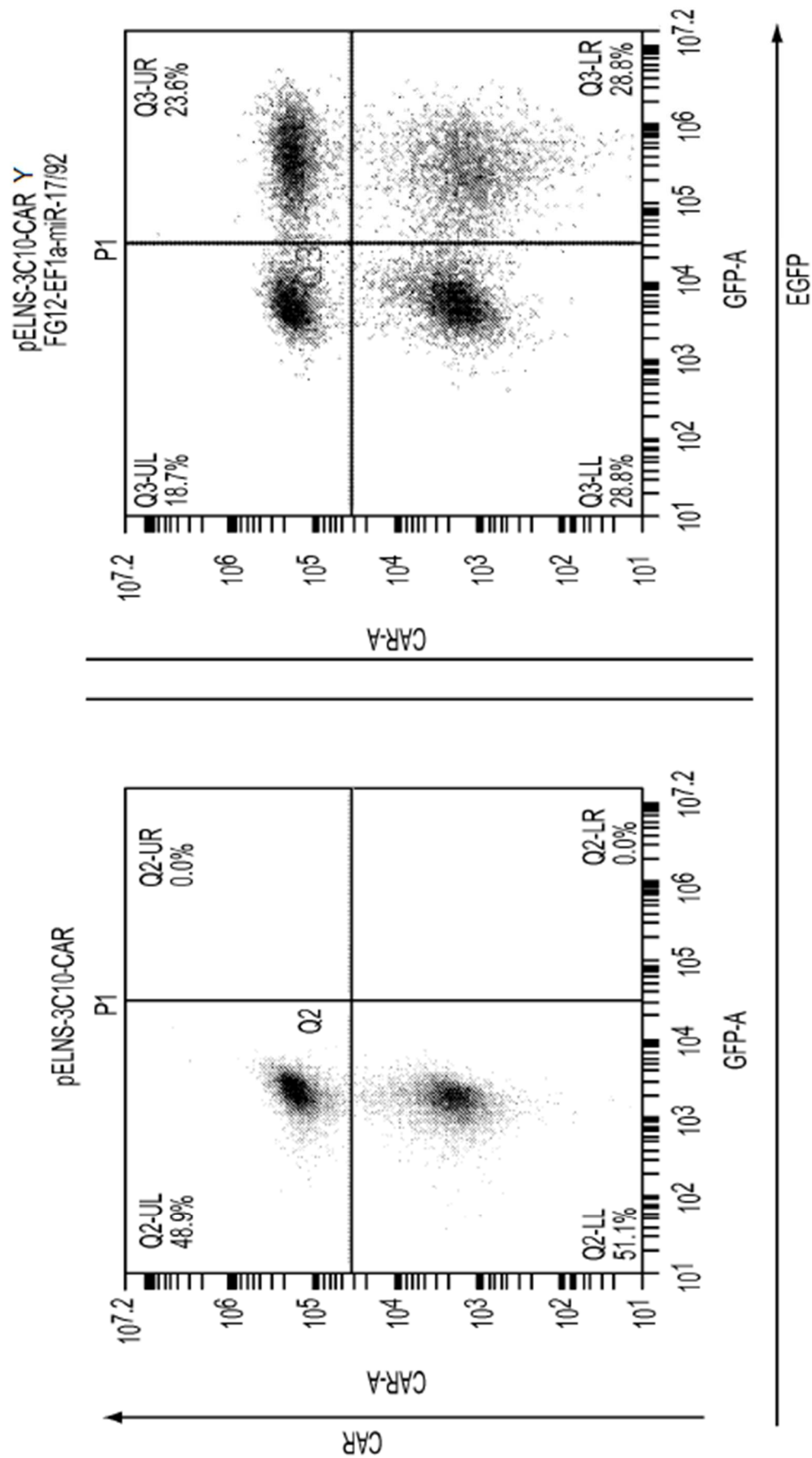


FIG. 2A

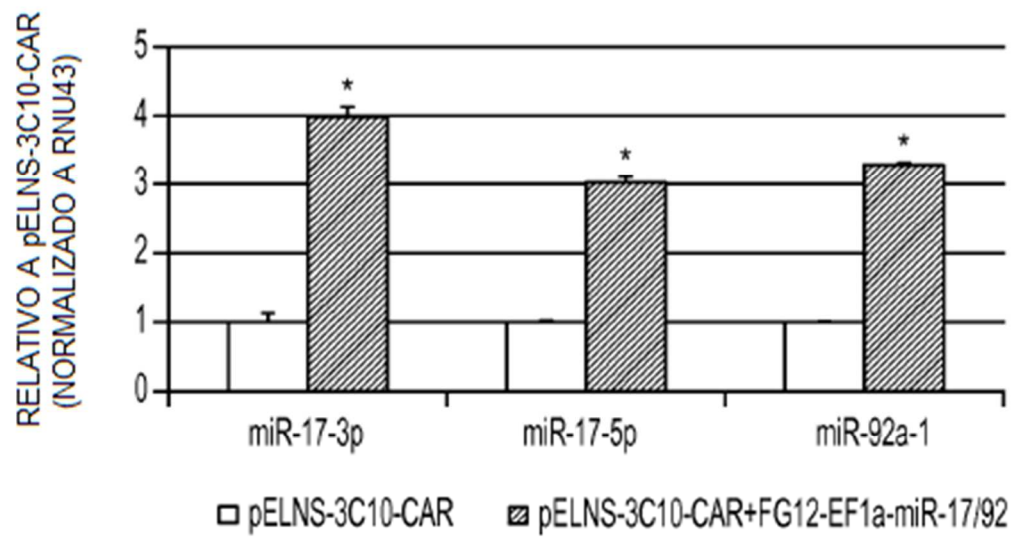


FIG. 2B

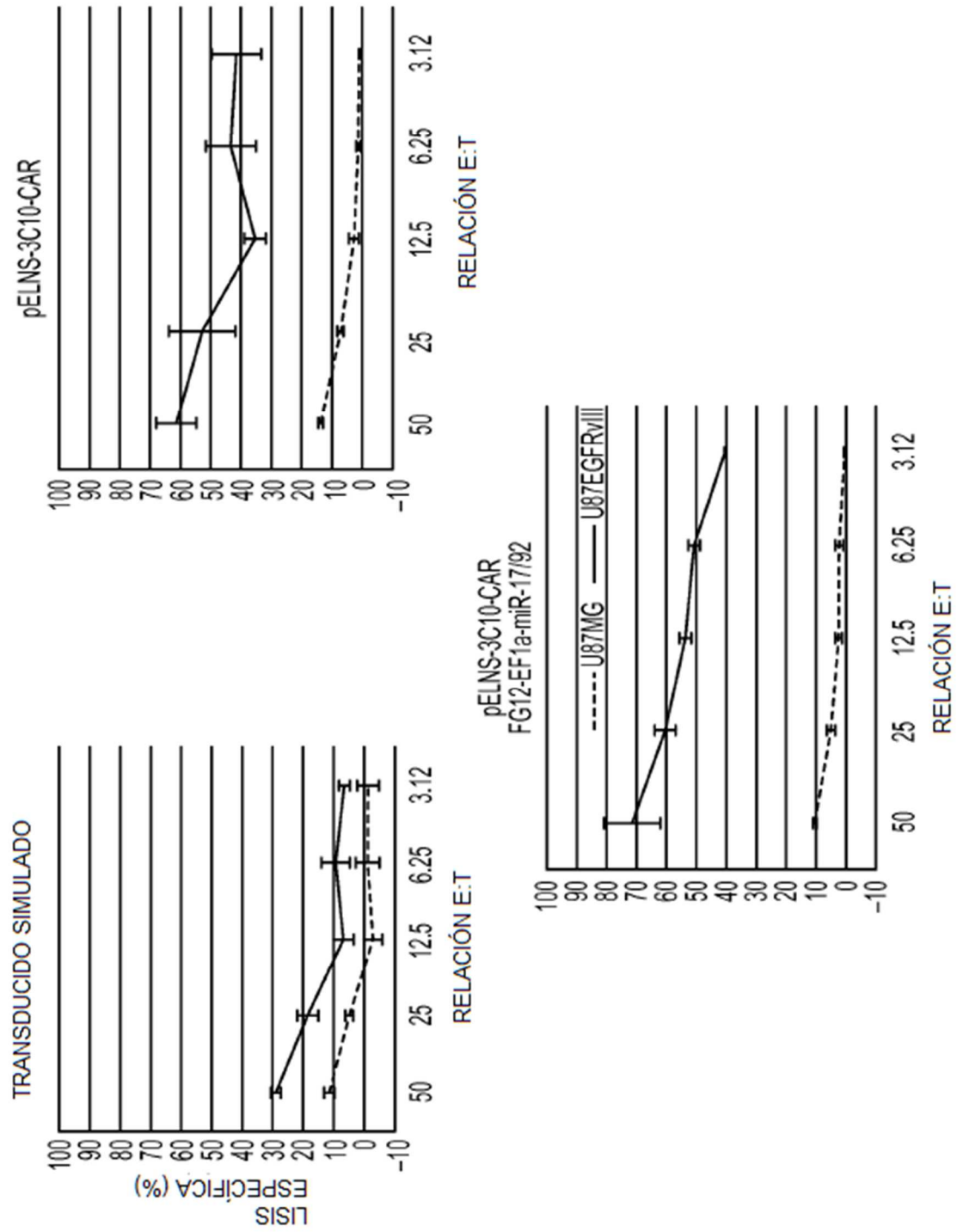


FIG. 2C

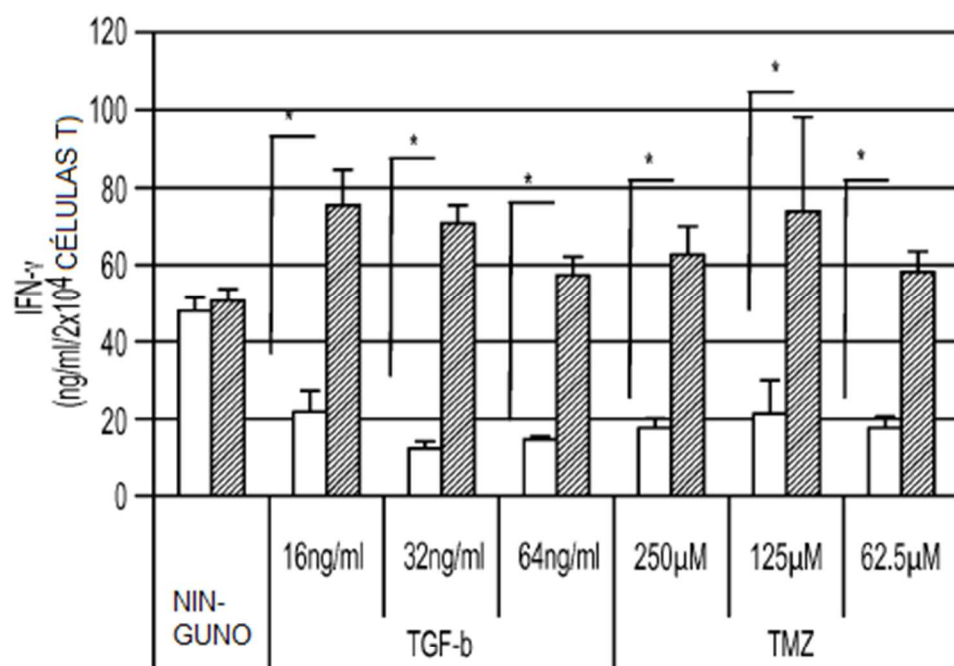


FIG. 3A

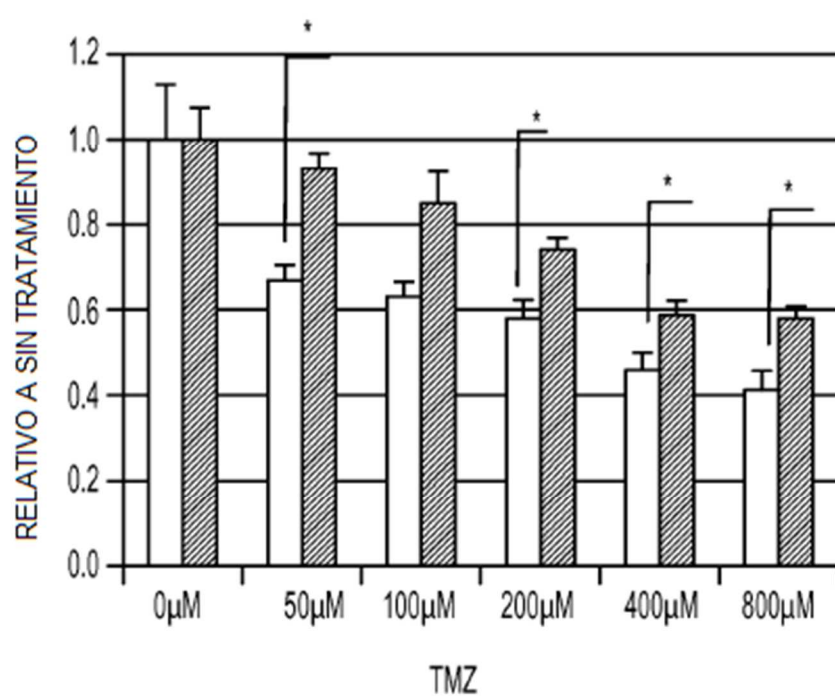


FIG. 3B

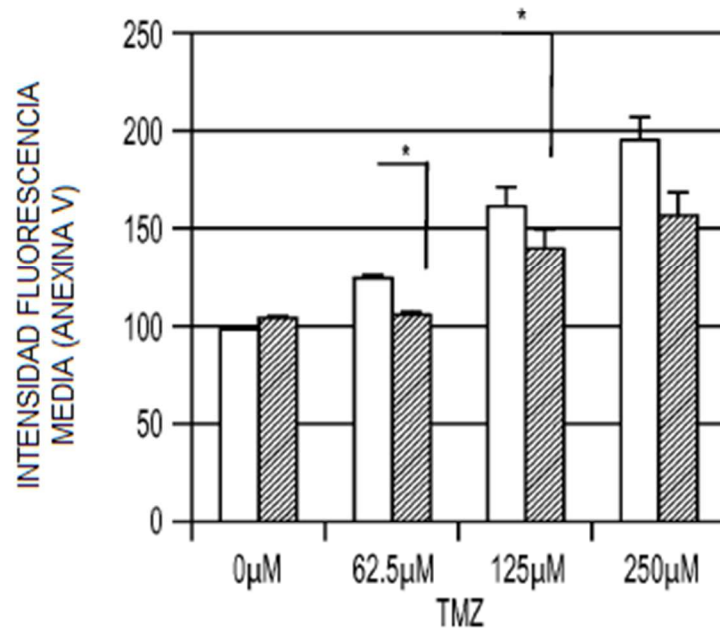
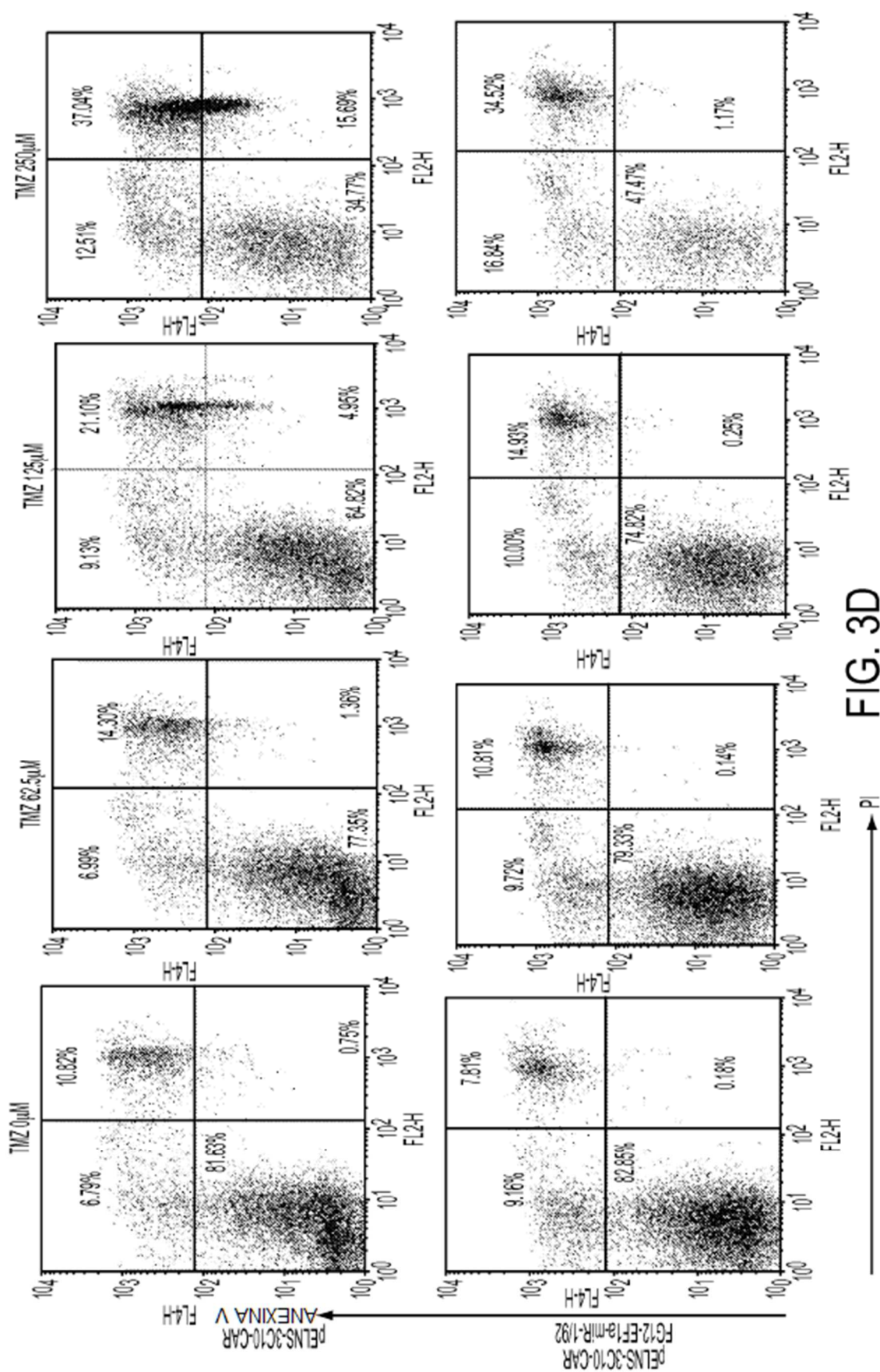


FIG. 3C



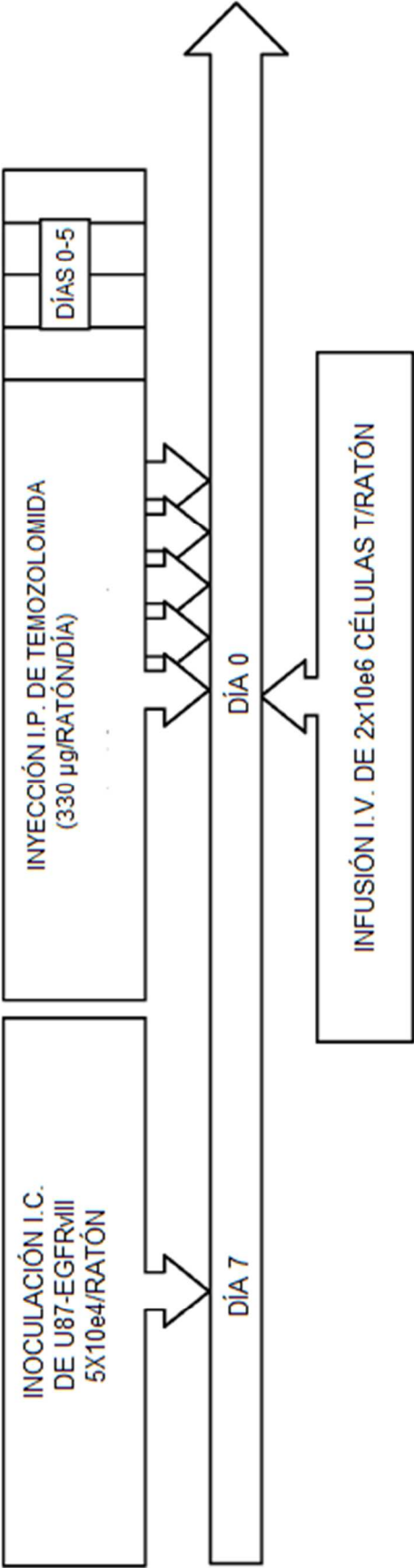


FIG. 4A

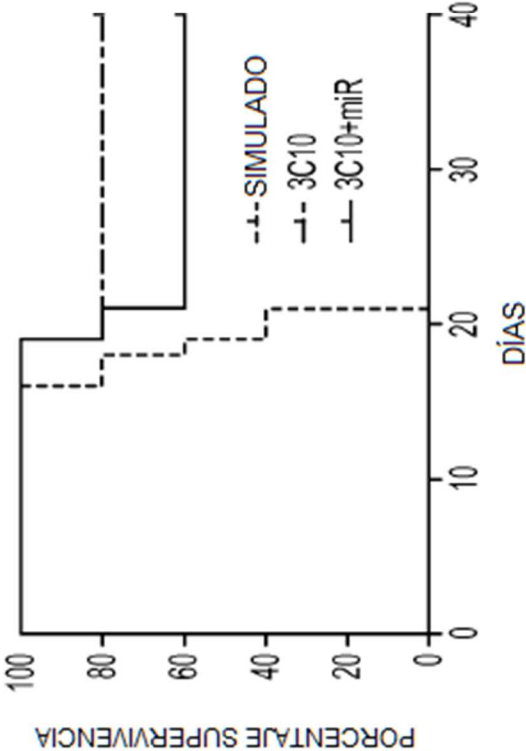


FIG. 4B

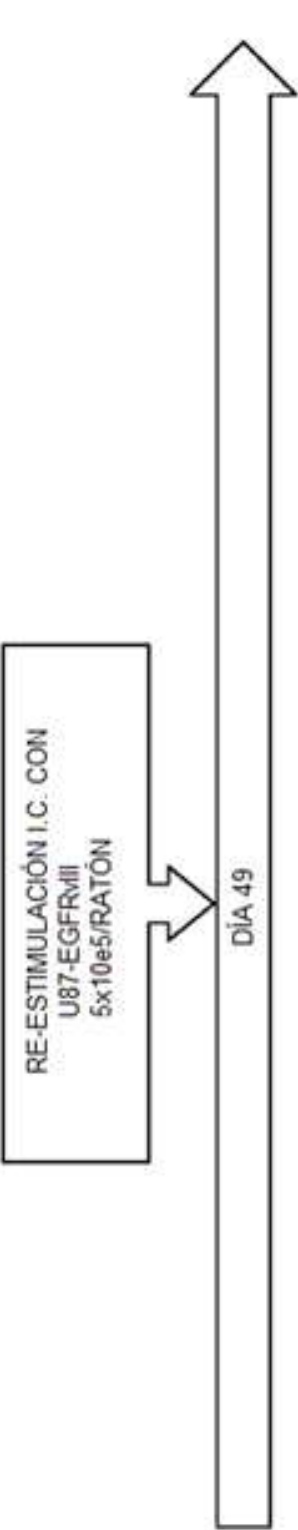


FIG. 5A

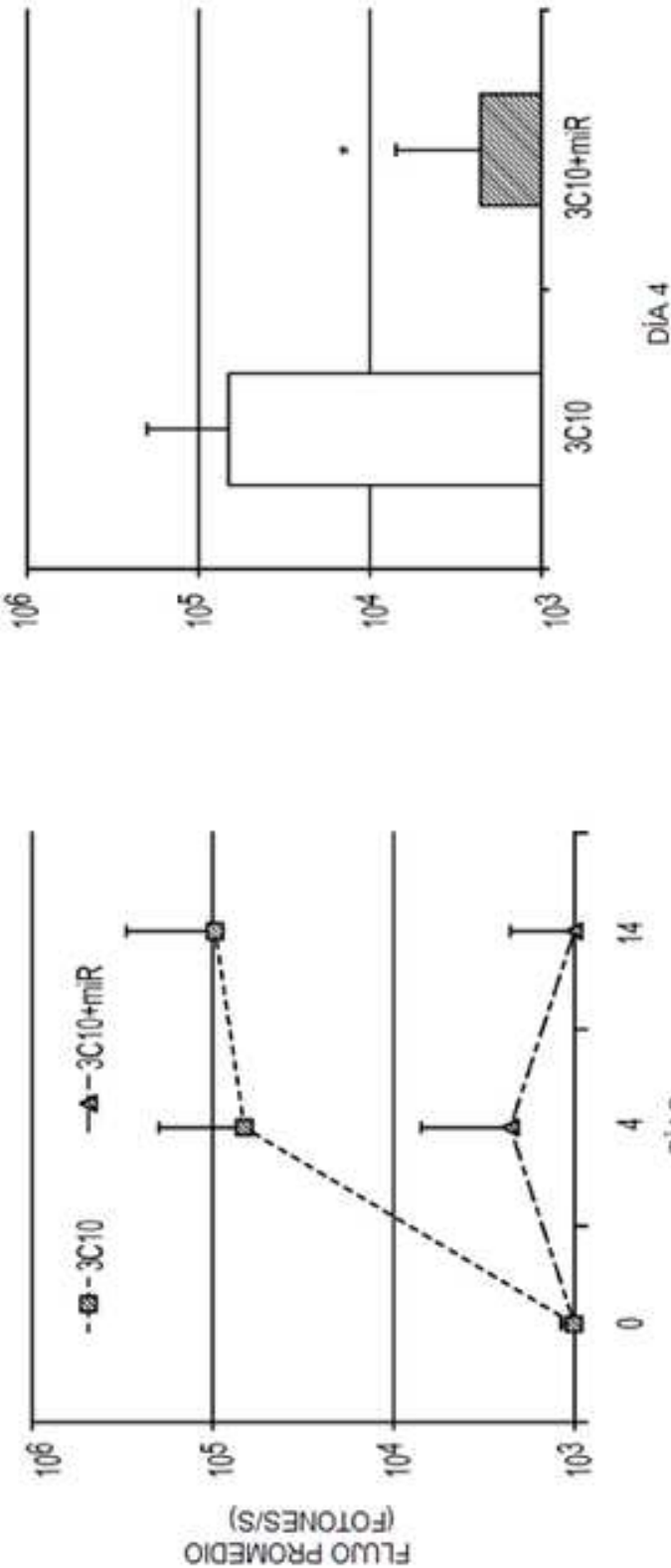


FIG. 5B

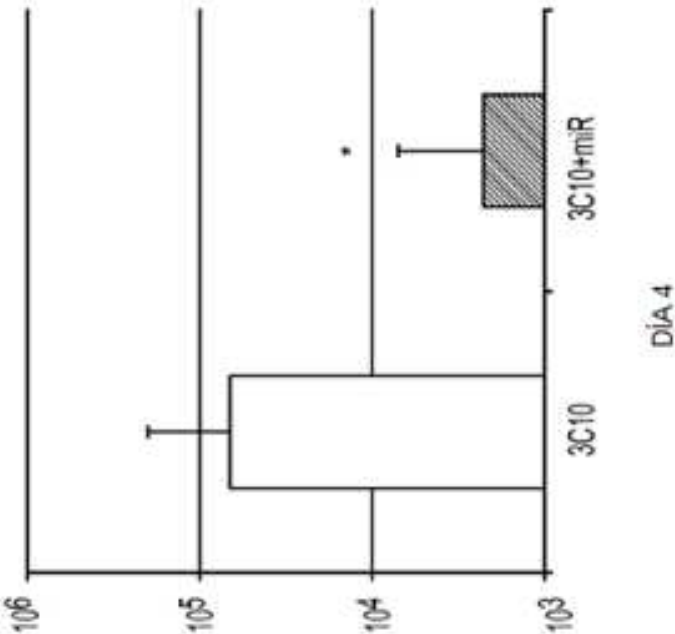
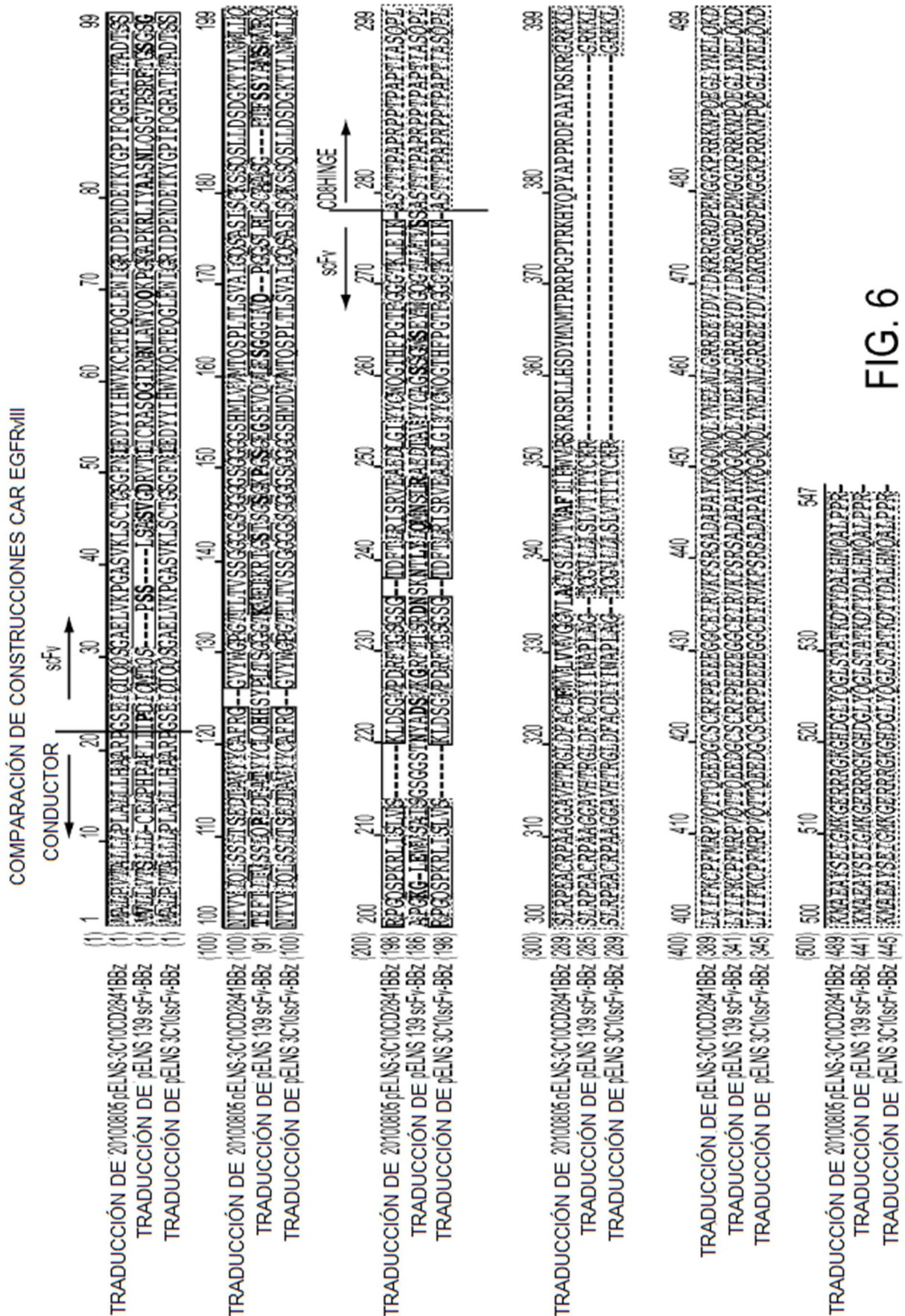


FIG. 5C



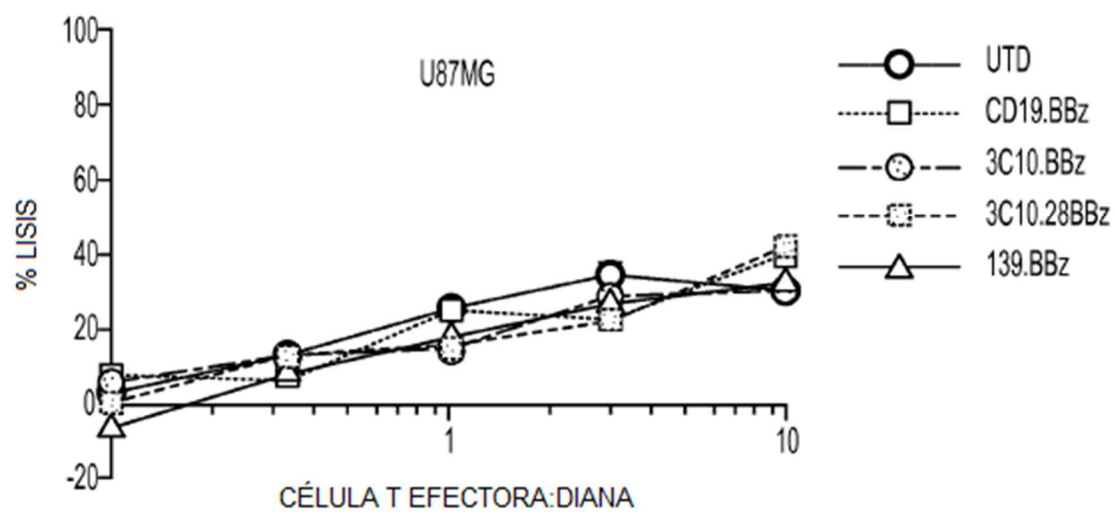


FIG. 7A

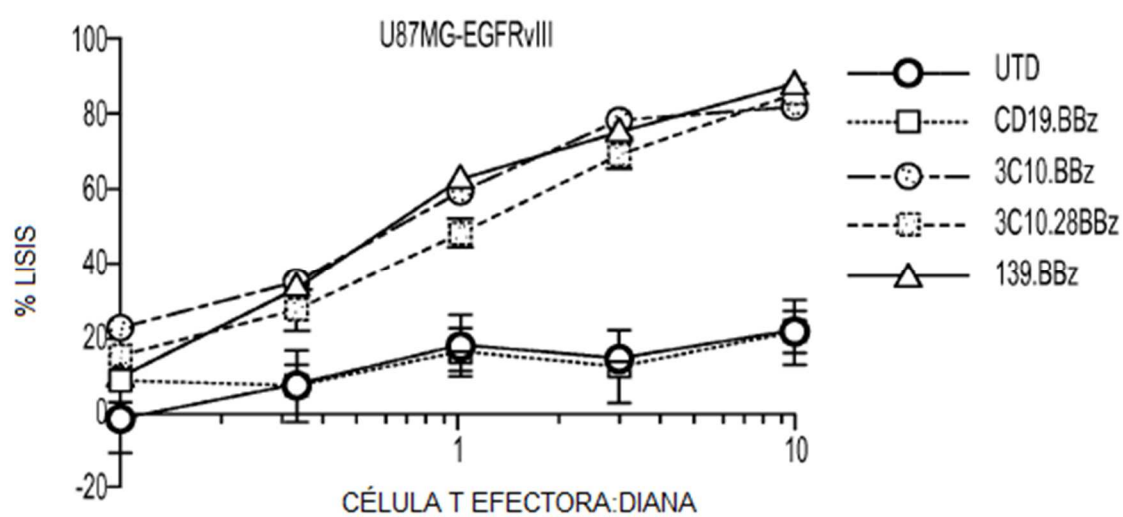


FIG. 7B

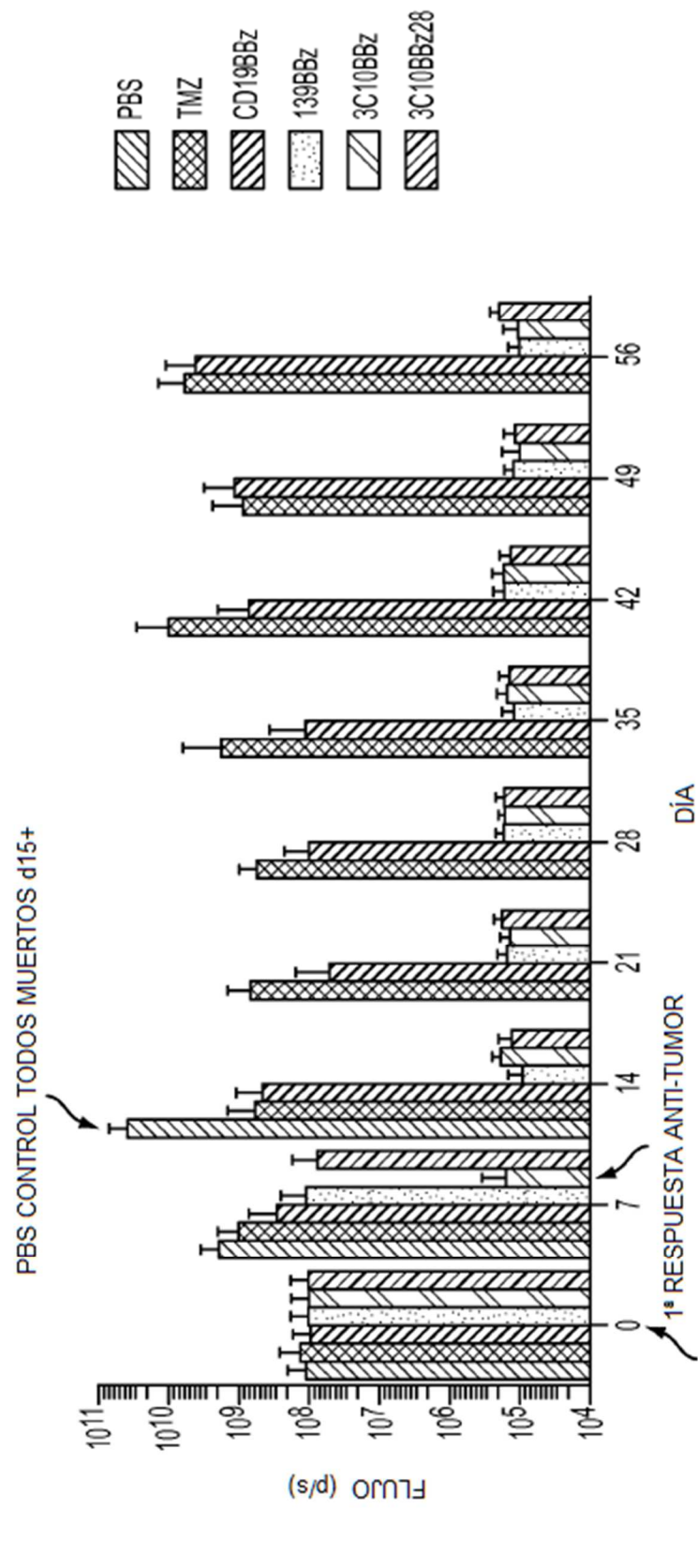


FIG. 8

CDR DEFINICIÓN CHOTIA	CDR H1	CDR H2
CDR DEFINICIÓN KABAT	CDR H1	CDR H2
NUMERACIÓN KABAT		
3C10 Vn MURINA	WVKQRTEQGLEWIGRIDP	ENDETKYGPFFQG
VH1_1fHz1	WVQQAPEGKGLEWNGRIDP	ENDETKYGPFFQG
VH5_5aHz1	WVRQMPGKGLEWNGRIDP	ENDETKYGPFFQG
CDR DEFINICIÓN CHOTIA	CDR H3	CDR H3
CDR DEFINICIÓN KABAT	CDR H3	CDR H3
NUMERACIÓN KABAT		
3C10 Vn MURINA	RVATITADTSSTNTVYQLSSLTSEDNAVYYCAFRGG	VYWGPGTTLTVSS
VH1_1fHz1	RVITITADTSSTNTVYMESSLSRSEDNAVYYCAFRGG	VYWGPGTTLTVSS
VH5_5aHz1	HVTISADTISINTVYQLWSSLSKASDTAMYYCAFRGG	VYWGPGTTLTVSS
CDR DEFINICIÓN CHOTIA	CDR L1	CDR L2
CDR DEFINICIÓN KABAT	CDR L1	CDR L3
NUMERACIÓN KABAT		
3C10 Vn MURINA	DVVMTQSPPLTSLVAIGQSAISCKSSQSLDSDGKTYLNNWLLQRPQGSPKRLISL	VSKLDSGVPDF
VK2_A17fHz1	DVVMTQSPPLSLPVTLGQPAISCKSSQSLDSDGKTYLNNWLLQRPQGSPKRLISL	VSKLDSGVPDF
VK4_B3fHz1	DVVMTQSPDLSLAVSLGERATINCSSQSLDSDGKTYLNNWLLQRPQGSPKRLISL	VSKLDSGVPDF
CDR DEFINICIÓN CHOTIA	CDR L3	CDR L3
CDR DEFINICIÓN KABAT	CDR L3	CDR L3
NUMERACIÓN KABAT		
3C10 VL MURINA	TGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGIVYCWQGTTHFP	GTFGGGTTKLEIK
VH2_A17fHz1	SGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIVYCWQGTTHFP	GTFGGGTTKVEIK
VH4_B3fHz1	SGSGSGTDFTLTSSIQAEADVAVYCWQGTTHFP	GTFGGGTTKVEIK

FIG. 9

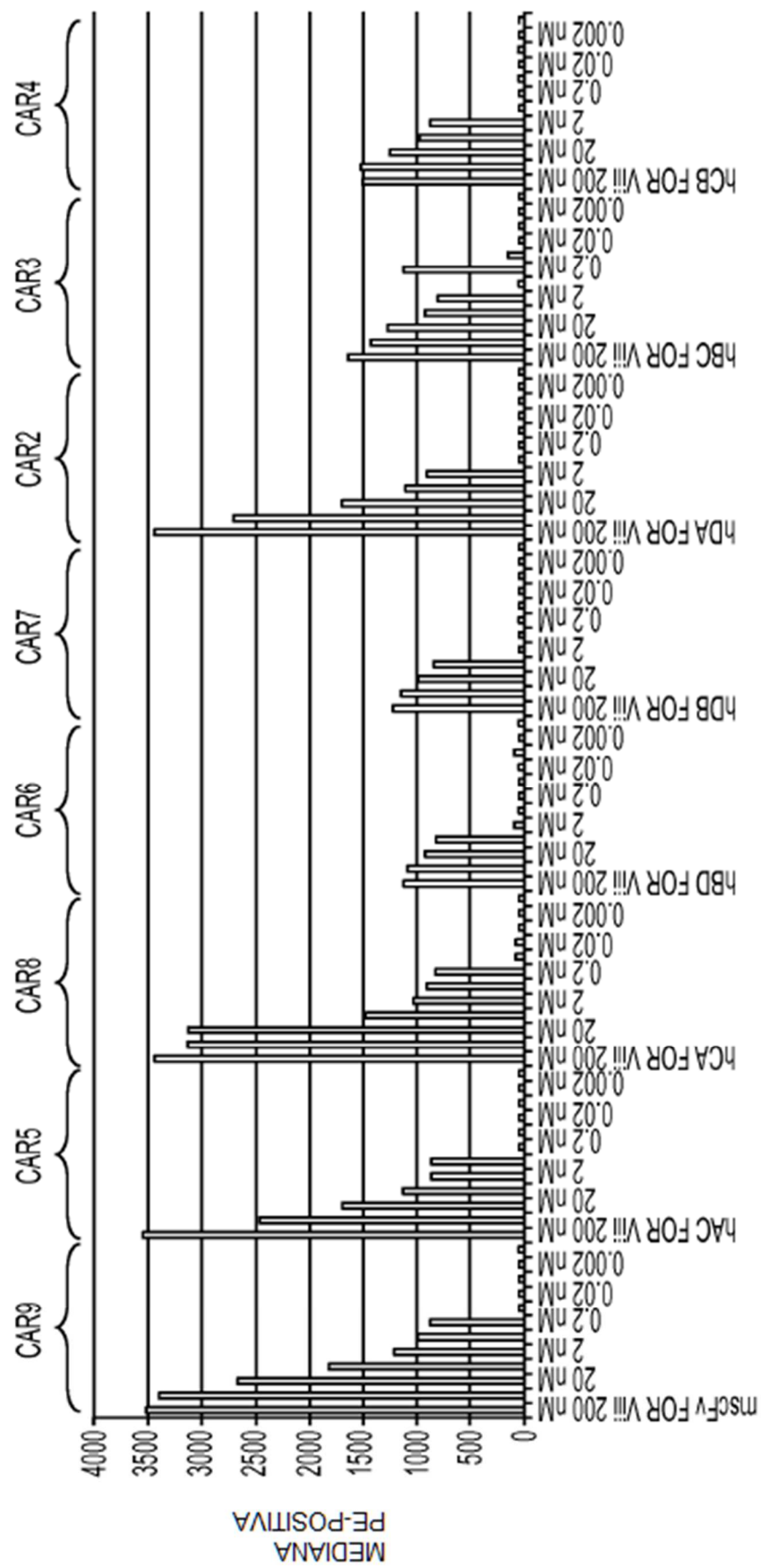


FIG. 10

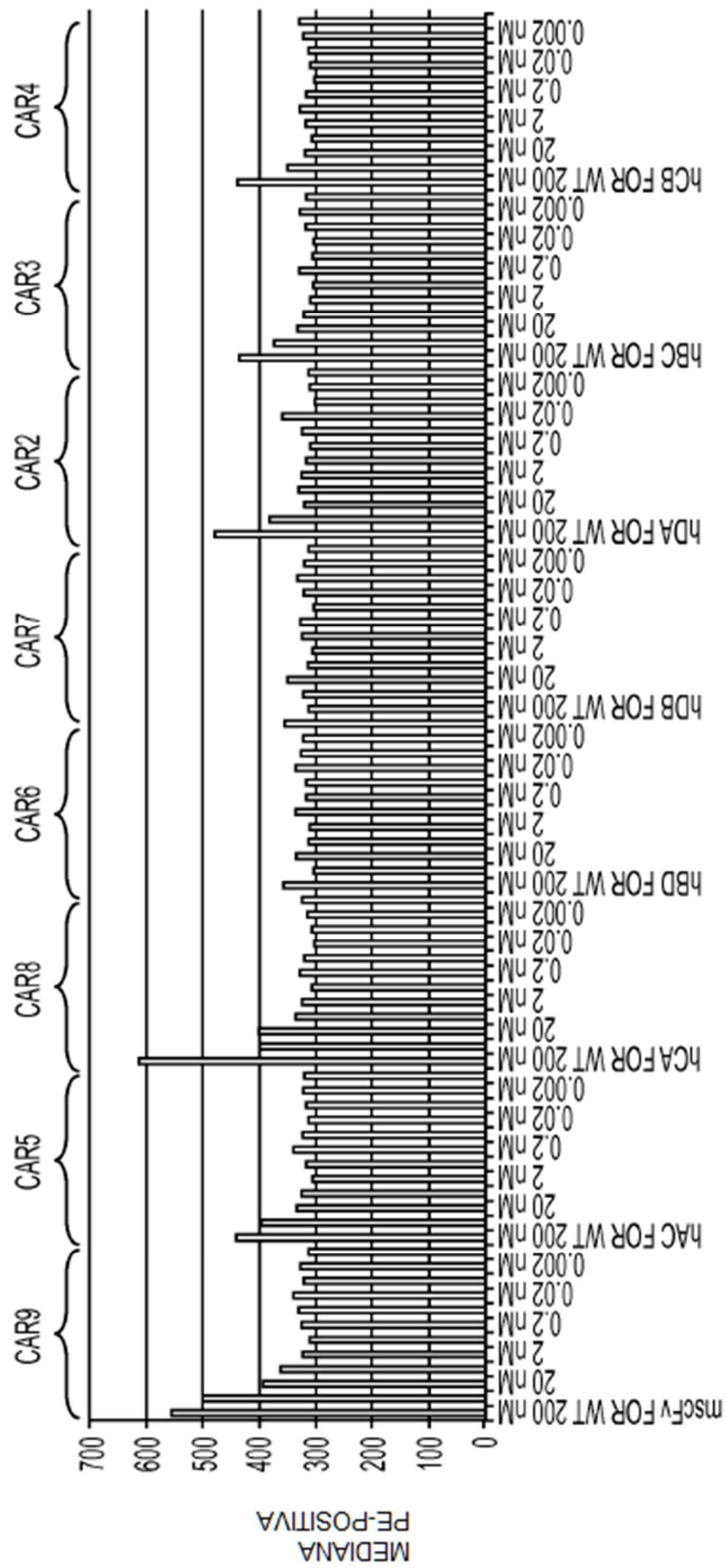


FIG. 11

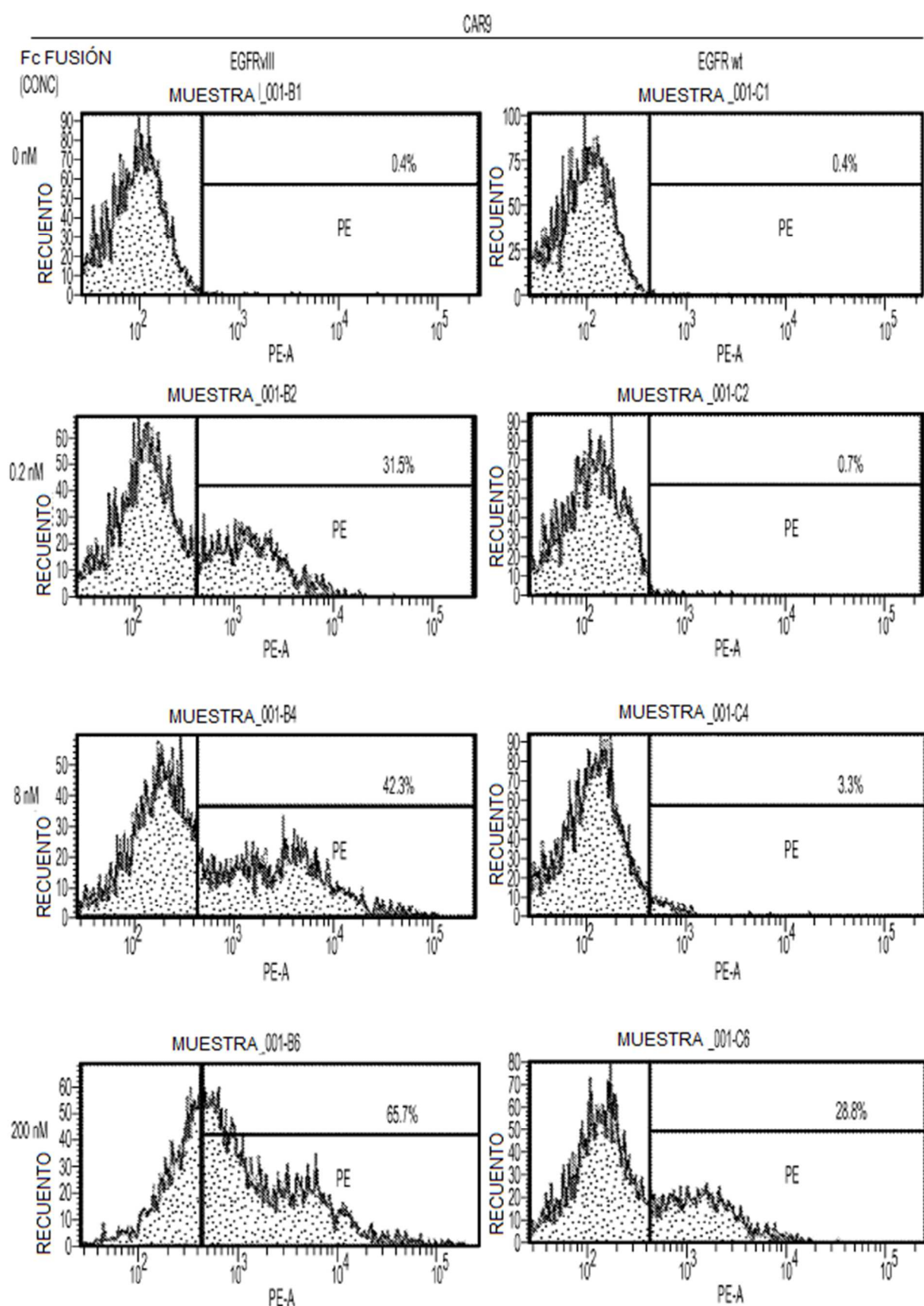


FIG. 12A

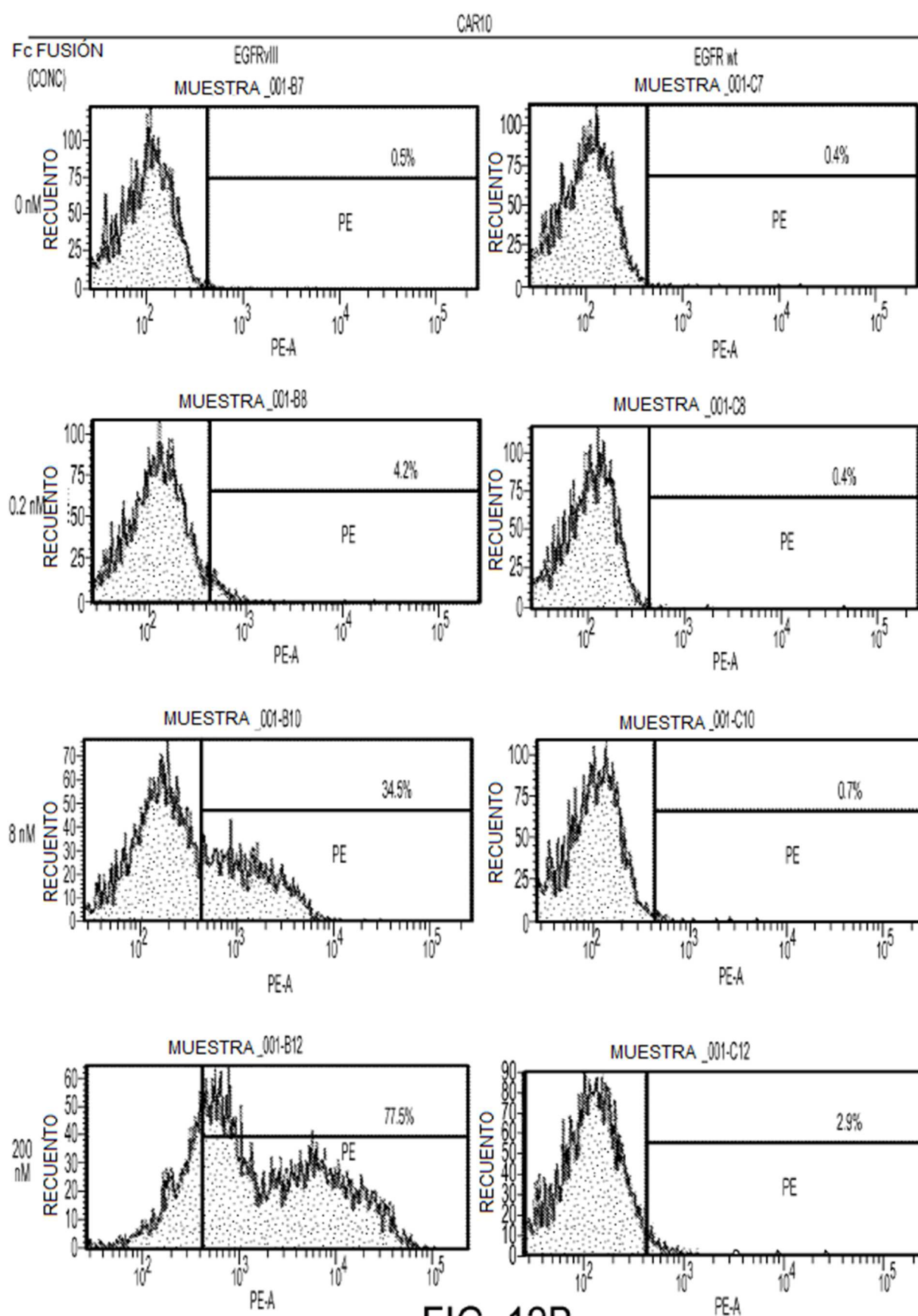


FIG. 12B

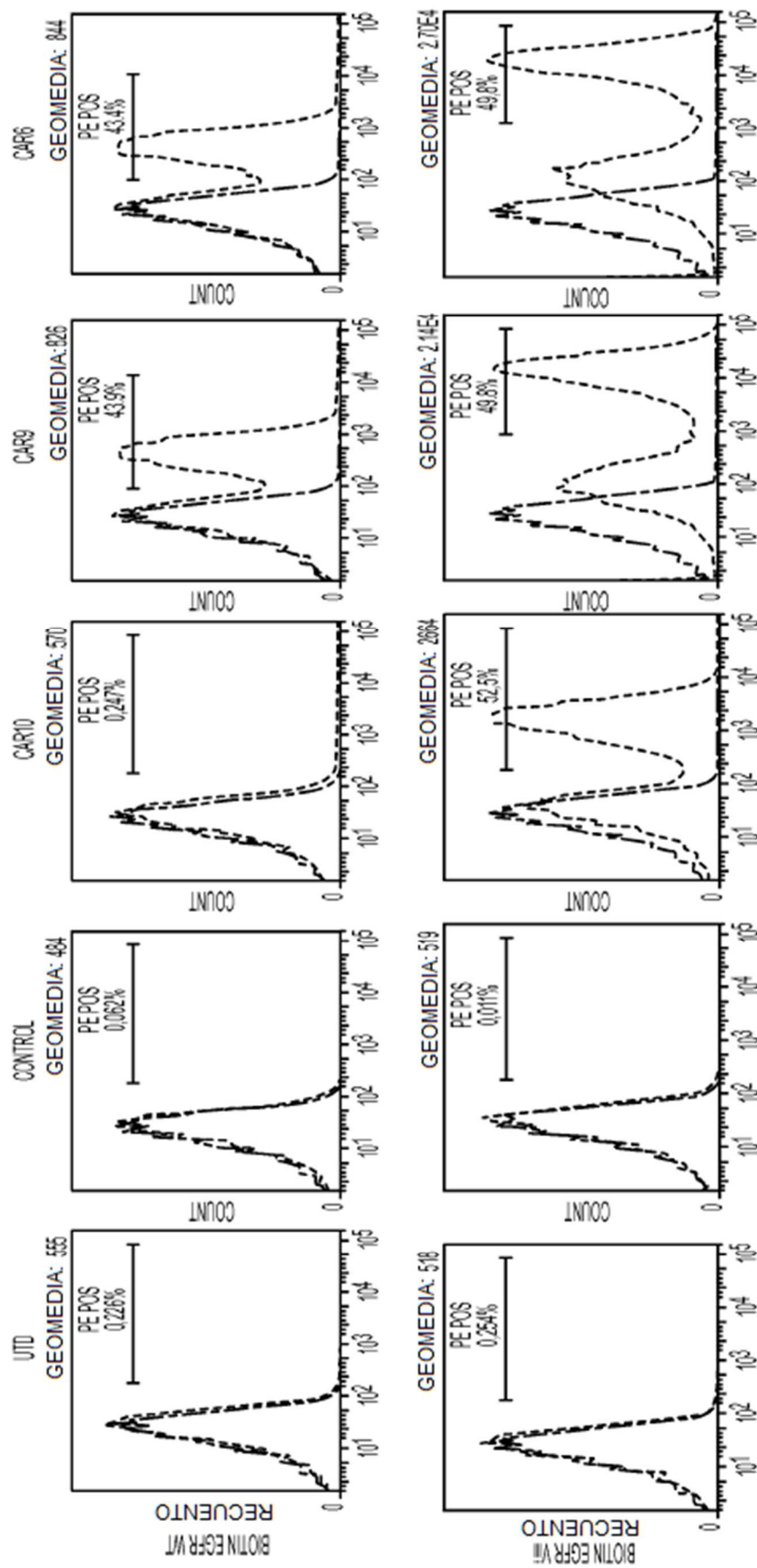


FIG. 13

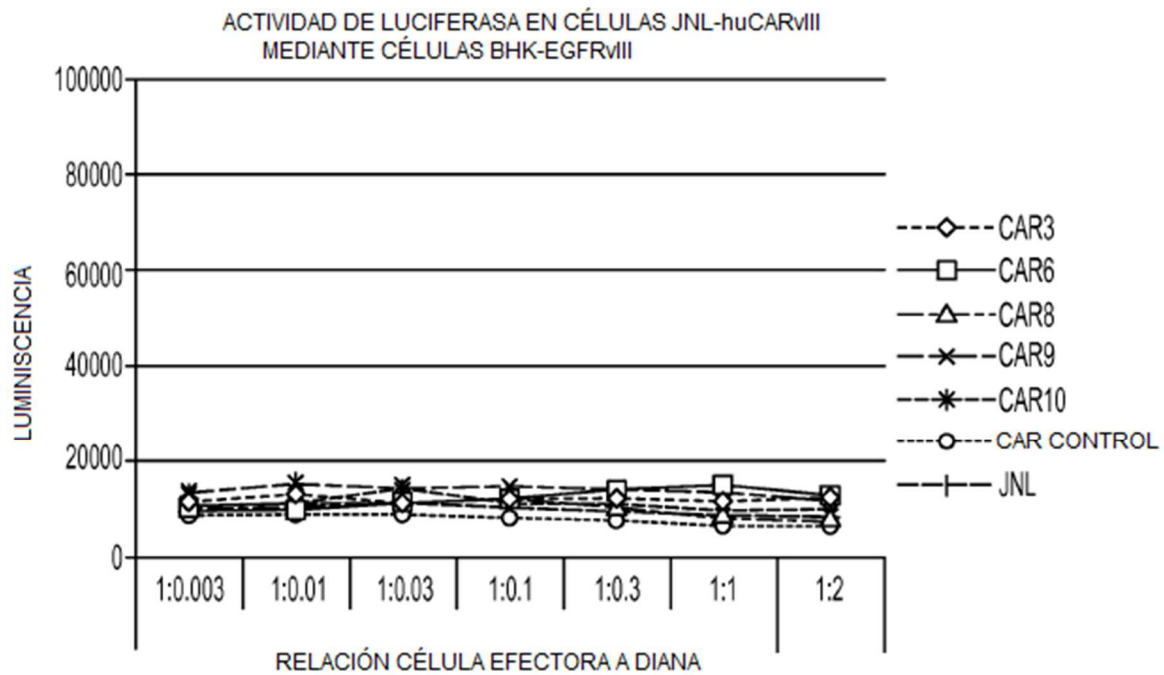
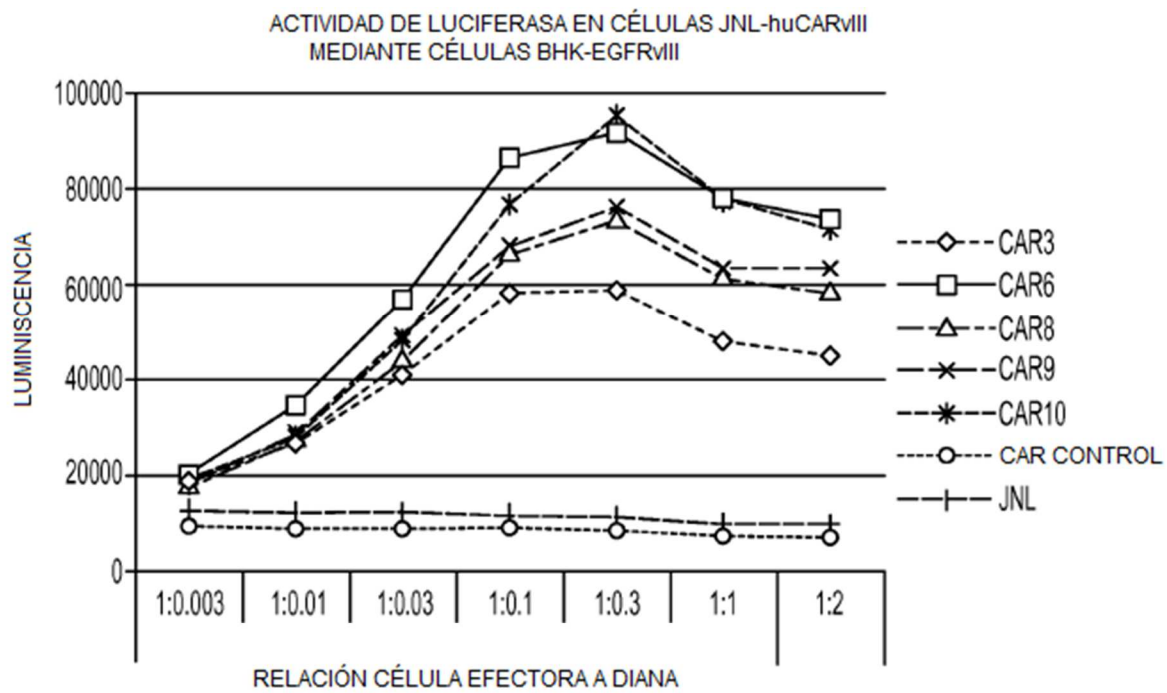


FIG. 14

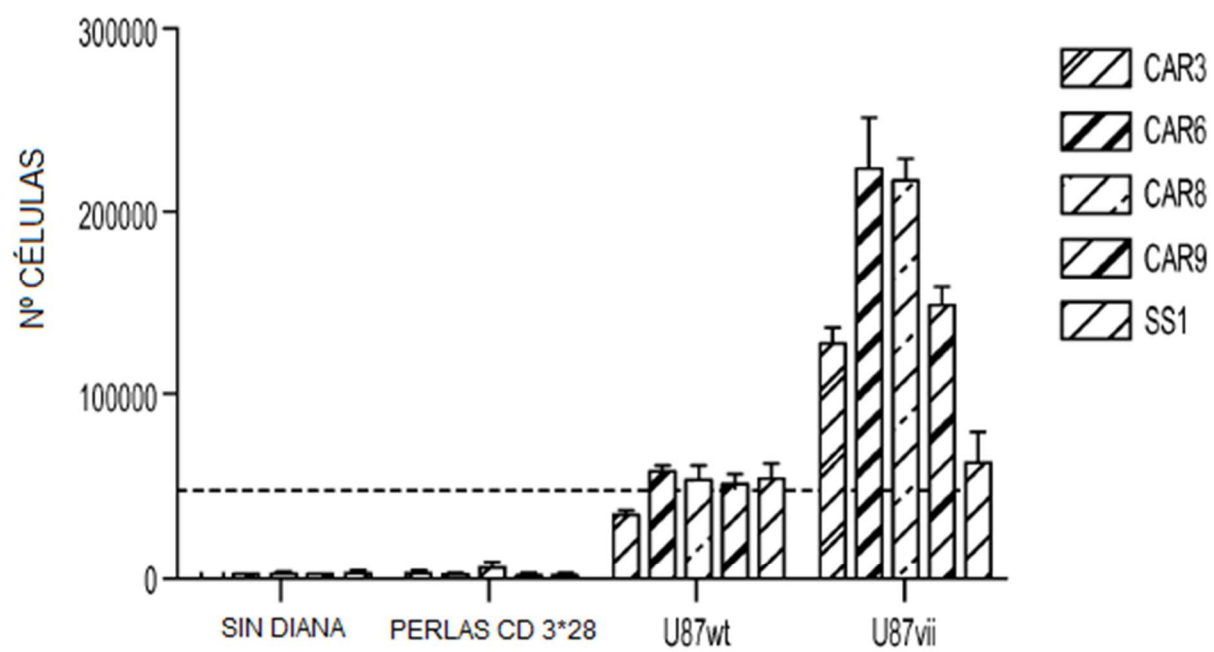


FIG. 15

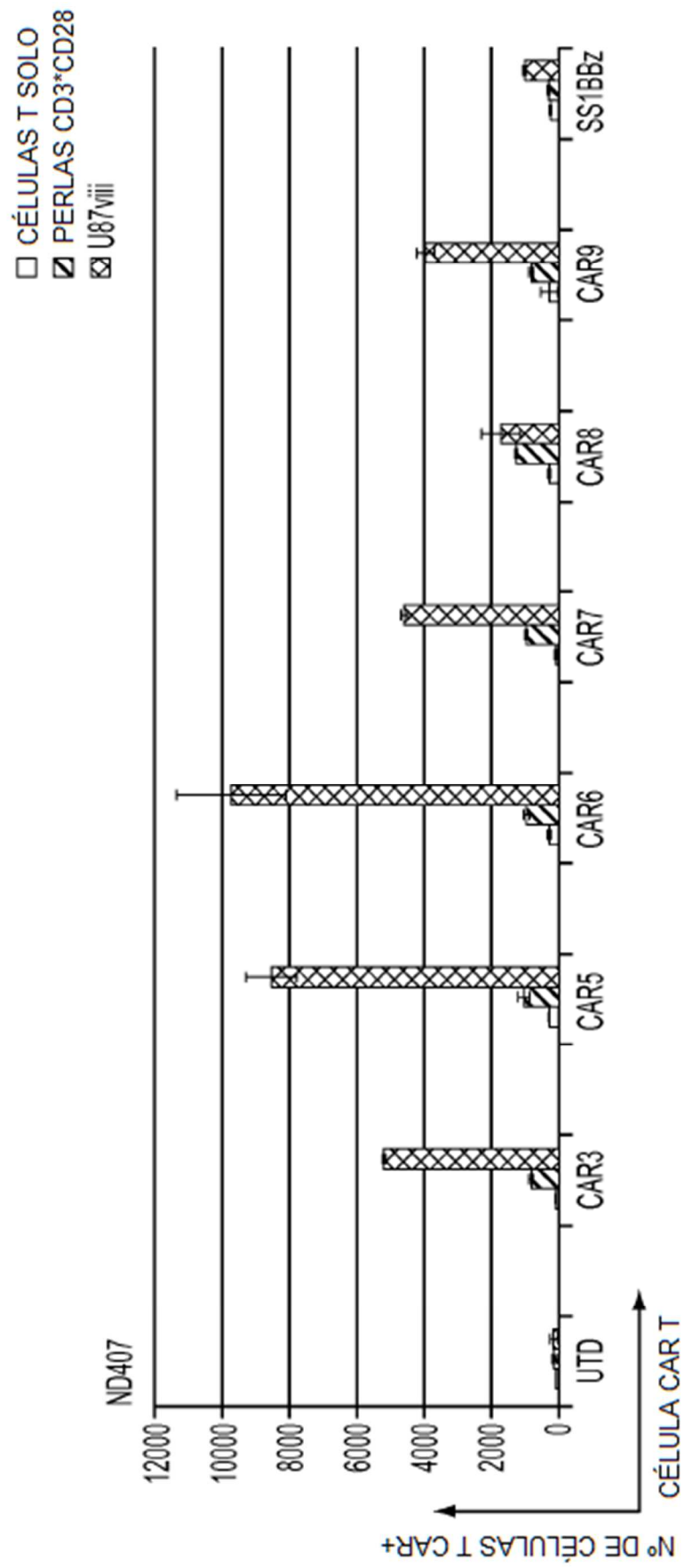


FIG. 16

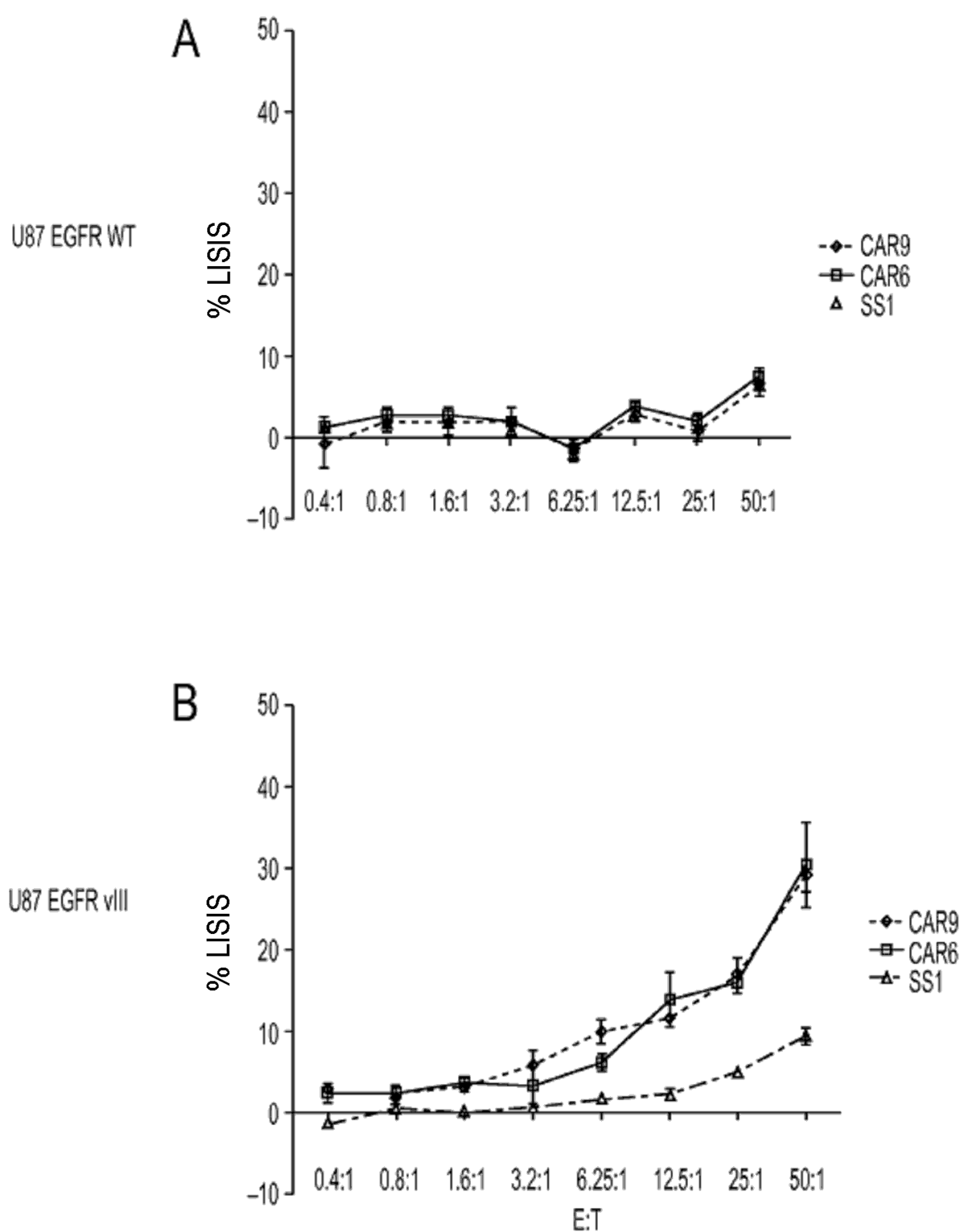


FIG. 17

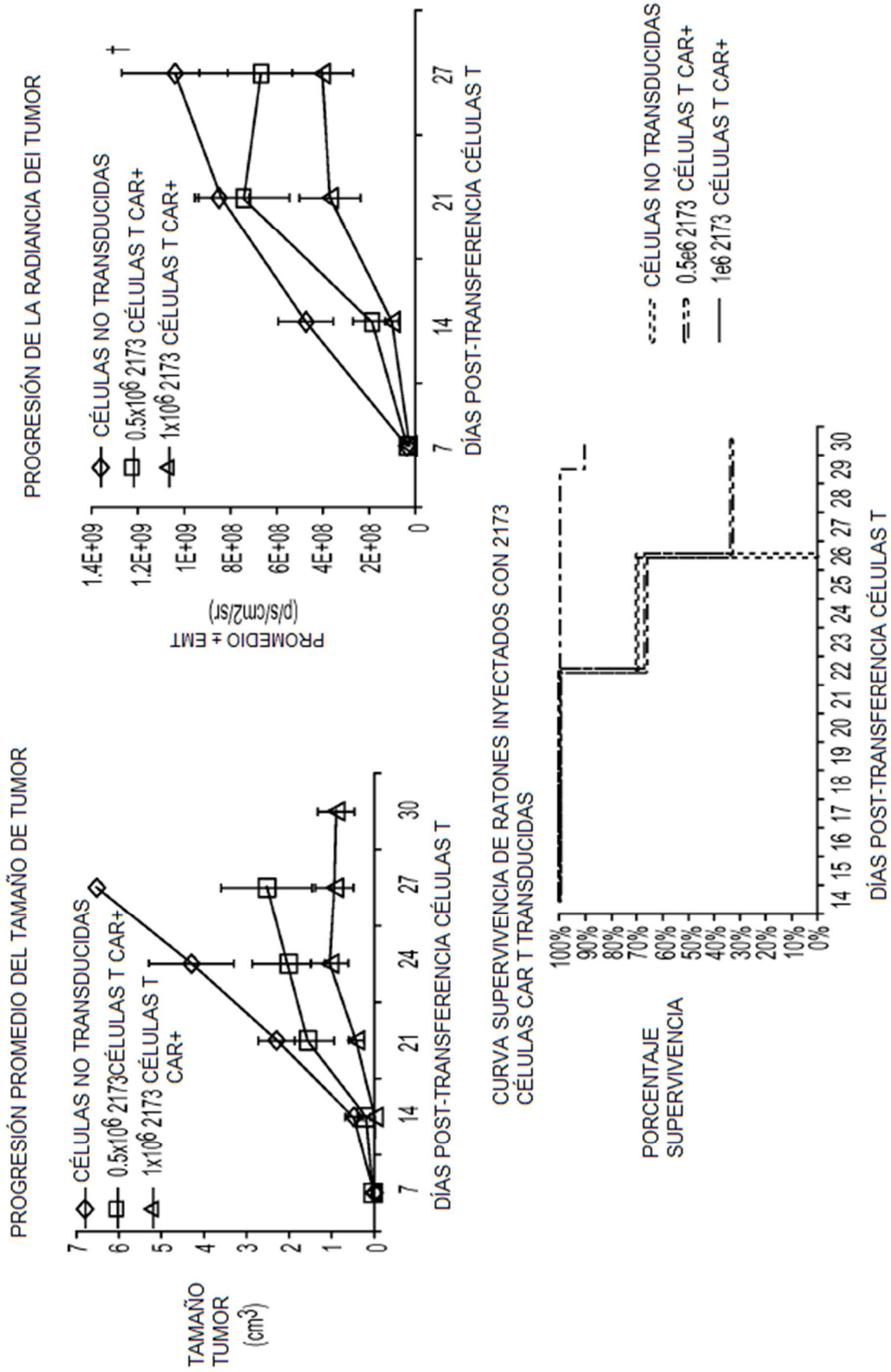


FIG. 18