

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 844 700**

51 Int. Cl.:

C07K 14/725 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.09.2015** **PCT/US2015/052227**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.03.2016** **WO16049459**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2015** **E 15845117 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.11.2020** **EP 3198010**

54 Título: **Receptores quiméricos de antígeno específicos de glipicano-3 para inmunoterapia adoptiva**

30 Prioridad:

26.09.2014 US 201462055979 P

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

22.07.2021

73 Titular/es:

BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE (100.0%)
One Baylor Plaza
Houston, TX 77030, US

72 Inventor/es:

HECZEY, ANDRAS;
GOTTSCHALK, STEPHEN, M. G.;
METELITSA, LEONID, S.;
DOTTI, GIANPIETRO y
LI, WENPENG

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 844 700 T3

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

DESCRIPCIÓN

Receptores quiméricos de antígeno específicos de glipicano-3 para inmunoterapia adoptiva

5 **Campo técnico**

La presente divulgación se refiere a al menos los campos de inmunología, biología celular, biología molecular y medicina.

10 **Antecedentes**

La inmunoterapia con linfocitos T específicos de antígeno se ha mostrado prometedora en el tratamiento de neoplasias en modelos preclínicos, así como estudios clínicos en fase I/II. Una estrategia atractiva para generar linfocitos T específicos de tumor es mediante modificación genética con receptores quiméricos de antígeno (CAR), que comprenden un dominio extracelular de reconocimiento de antígeno, un dominio transmembranario y un dominio de señalización intracelular derivado de la cadena CD3- ζ del receptor de linfocitos T a menudo ligado a endodominios de molécula coestimulante.

Hay una búsqueda continua de antígenos expresados en células cancerosas que no se encuentran en tejidos maduros normales. El glipicano-3 (GPC3) es un miembro de la familia de glipicano, un grupo de proteoglucanos de sulfato de heparano ligados a la superficie celular a través de un anclaje de glucosil-fosfatidilinositol. El GPC3 está codificado en Xp26 y su defecto causa el síndrome de Simson-Golabi-Behmel de tipo 1. El GPC3 se expresa en una amplia diversidad de tejidos durante el desarrollo, pero no en tejidos maduros a causa de la supresión por la metilación del ADN dentro de la región promotora. El GPC3 se detecta en el 100 % de hepatoblastoma epitelial (HB), hasta el 100 % de carcinoma hepatocelular (HCC), el 58 % de sarcoma embrionario (ES), el 100 % de teratomas rabdoides atípicos (ATRT), el 38-75 % de tumor de Wilms (WT), el 67 % de tumores rabdoides malignos (RT), hasta el 100 % de coriocarcinoma (CC) y hasta el 100 % de tumores del saco vitelino (YST). Por tanto, el GPC3 es una diana inmunoterápica ideal.

El documento US 2014/0044714 describe la identificación de anticuerpos monoclonales humanos que se unen a GPC3 o cadenas de sulfato de heparano en GPC3. El documento WO 2013/070468 describe composiciones y métodos para diagnosticar y tratar enfermedades, trastornos o afecciones asociadas con la expresión desregulada de GPC3 usando anticuerpos que se unen específicamente a 5 glipicano-3 y un CAR específico para GPC3. Li Yonghai *et al.* (2014) (HEPATOLOGY, noviembre de 2014, vol. 60, n.º supl. 1, página 870A) describe la validación *in vitro* de CAR específicos de GPC3 humano para carcinoma hepatocelular. Gao *et al.* (2014), (CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 20, n.º 24, páginas 6418 - 6428) describe el desarrollo de linfocitos T redirigidos a GPC3 para el tratamiento de carcinoma hepatocelular. Li Wengpen *et al.* (2015) (MOLECULAR THERAPY, vol. 23, n.º supl. 1, páginas S164 - S165) describe la inmunoterapia de carcinoma hepatocelular con linfocitos T genomanipulados para expresar receptores quiméricos de antígeno específicos de glipicano-3. El documento EP 2995682 describe un ácido nucleico que codifica un receptor quimérico de antígeno expresado a la superficie de un linfocito T, que comprende un dominio extracelular de unión, una región transmembranaria y un dominio de señalización intracelular, en el que el dominio extracelular de unión comprende un anticuerpo monocatenario, scFv(GPC3), que reconoce específicamente el epítipo C terminal de GPC3 y un linfocito modificado genéticamente que expresa el CAR. El documento WO 2017/020812 describe anticuerpos contra GPC3, incluyendo un anticuerpo monocatenario y un anticuerpo humanizado. Cartellieri *et al.* (2010) (JOURNAL OF BIOMEDICINE AND BIOTECHNOLOGY, vol. 21, n.º 4, páginas 1-13) describe linfocitos T genomanipulados con receptor quimérico de antígeno para inmunoterapia del cáncer. Toretsky *et al.* (2001) (JOURNAL OF PEDIATRIC HEMATOLOGY/ONCOLOGY, vol. 23, n.º 8, páginas 496 - 499) describe la expresión de glipicano-3 en tumor de Wilms y hepatoblastoma. Li *et al.* (2012) (BMC BIOTECHNOLOGY, vol. 12, n.º 1, página 23) describe la validación de un scFv específico de glipicano-3 aislado de una colección de presentación emparejada/presentación en fagos secretores. Song *et al.* (2011) (CANCER RESEARCH, vol. 71, n.º 13, páginas 4617 - 4627) describe la persistencia *in vivo*, la localización tumoral y la actividad antitumoral de linfocitos T genomanipulados con CAR potenciadas por señalización coestimulante a través de CD137. Heczey *et al.* (2014) (BLOOD, vol. 124, n.º 18, páginas 2824 - 2833) describe linfocitos NKT invariables con receptor quimérico de antígeno que proporcionan una plataforma para inmunoterapia del cáncer. Heczey *et al.* (2013) (THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, 190, 132.9) describe linfocitos NKT como plataforma para inmunoterapia del cáncer con receptores quiméricos de antígeno.

Breve resumen de la divulgación

La presente divulgación se refiere a métodos y/o composiciones para el tratamiento del cáncer. En casos particulares, la divulgación se refiere a métodos y/o composiciones para el tratamiento de cánceres en que las células cancerosas comprenden GPC3, por ejemplo, como un antígeno tumoral. Aunque, en determinados aspectos, el cáncer puede ser de cualquier tipo, en casos particulares el cáncer es hepatoblastoma, carcinoma hepatocelular, tumores rabdoides malignos, tumores del saco vitelino, sarcoma indiferenciado del hígado, liposarcoma, tumor de Wilms o coriocarcinoma. En aspectos específicos descritos en el presente documento, el cáncer comprende tumores sólidos. En al menos algunos casos, el cáncer no es un carcinoma hepatocelular.

Un aspecto descrito en el presente documento proporciona inmunocitos que expresan un receptor quimérico de antígeno (CAR) dirigido a GPC3, en el que en al menos aspectos específicos descritos en el presente documento el CAR no comprende un dominio dirigido a antígeno que es, o que deriva de, anticuerpos 3E11, 2G9, 4G5, 3D8 o 2E10.

- 5 En determinados aspectos descritos en el presente documento, el CAR comprende un fragmento variable monocatenario (scFv) específico para GPC3. En un aspecto más específico descrito en el presente documento, el CAR GPC3 comprende un scFv derivado del anticuerpo GC33. En otro aspecto específico descrito en el presente documento, el CAR GPC3 comprende un scFv que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO:1. El
10 CAR GPC3 puede estar codificado por una secuencia polinucleotídica codificada por SEQ ID NO:2.

- Los CAR específicos de GPC3 descritos en el presente documento (que pueden denominarse CAR GPC3) pueden incluir uno o más endodominios coestimulantes, tales como CD28, CD27, 4-1BB, OX40, ICOS o una combinación de los mismos. El CAR puede incluir uno o más dominios transmembranarios, tal como uno seleccionado del grupo que
15 consiste en CD3-zeta, CD28, CD8 α , CD4 y una combinación de los mismos. En un aspecto específico descrito en el presente documento, el CAR comprende un dominio transmembranario derivado de CD28 y no de CD8.

- En algunos aspectos, se describe en el presente documento el CAR específico de GPC3 proporcionado en el presente documento que comprende un dominio transmembranario seleccionado del grupo que consiste en CD3-zeta, CD28, CD8 α , CD4 o una combinación de los mismos. En un aspecto específico descrito en el presente documento, el CAR
20 comprende un dominio transmembranario derivado de CD28 y no de CD8. En aspectos particulares descritos en el presente documento, el CAR comprende un endodominio de molécula coestimulante seleccionado del grupo que consiste en CD28, CD27, 4-1BB, OX40, ICOS y una combinación de los mismos. En otro aspecto específico descrito en el presente documento, el dominio coestimulante de los CAR específicos de GPC3 proporcionados en el presente
25 documento comprende un dominio coestimulante CD28. En otro aspecto específico descrito en el presente documento, el dominio coestimulante comprende un dominio coestimulante 4-1BB (CD137). En otro aspecto específico, el dominio coestimulante comprende un dominio coestimulante CD28 y un dominio coestimulante 4-1BB.

- Otro aspecto descrito en el presente documento proporciona inmunocitos que expresan un CAR específico de GPC3
30 descrito en el presente documento. En determinados aspectos descritos en el presente documento, los inmunocitos son linfocitos T, linfocitos NK, células dendríticas, linfocitos NKT o una mezcla de los mismos. En aspectos específicos descritos en el presente documento, en que los inmunocitos son linfocitos T, los linfocitos T pueden ser linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, linfocitos Treg, linfocitos T Th1+, linfocitos T Th2+, linfocitos T Th17+, linfocitos T inespecíficos o una población de linfocitos T que comprende una combinación de cualquiera de los anteriores. En
35 otros determinados aspectos descritos en el presente documento, los CAR específicos de GPC3 descritos en el presente documento se expresan en otros inmunocitos, incluyendo, aunque sin limitación, linfocitos NK, linfocitos NKT, linfocitos $\gamma\delta$ T o linfocitos T que reconocen antígenos específicos (por ejemplo, antígenos víricos u otros asociados a tumores) a través de su receptor natural de linfocitos T. Los inmunocitos pueden portar un polinucleótido que codifica el CAR, y el polinucleótido puede comprender además un gen suicida. En algunos aspectos descritos en el presente
40 documento, los inmunocitos no son linfocitos T, linfocitos citolíticos naturales (NK), linfocitos T citolíticos naturales (NKT), linfocitos $\gamma\delta$ -T, linfocitos T invariables asociados a la mucosa (linfocitos MAIT), células linfoides innatas, células dendríticas o una mezcla de los mismos. Además, los CAR GPC3 pueden expresarse en células madre y/o progenitoras que posteriormente se diferencian en los inmunocitos mencionados anteriormente. En determinados aspectos descritos en el presente documento, los linfocitos T redirigidos contra GPC3 controlan el crecimiento de
45 células que expresan GPC3, incluyendo células cancerosas, *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo, en un individuo que tiene un cáncer que comprende células tumorales que expresan GPC3. Las células son eficaces contra múltiples tumores sólidos, en aspectos particulares descritos en el presente documento.

- Como se describe en detalle en el presente documento, la expresión de GPC3 está bien descrita en la bibliografía científica en diversos tipos de cáncer en un amplio panel de series de tumores y tejidos normales y en conjuntos de
50 datos de expresión génica. En el presente documento, la expresión de GPC3 se validó en líneas celulares tumorales ensayadas ilustrativas. Se generó un CAR específico de GPC3 que mostró que cuando se expresaba por linfocitos T, hepatoblastoma, carcinoma hepatocelular y tumor rabdoide maligno (como ejemplo) se abordaban de manera eficaz *in vitro*, y se observó actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo* contra carcinoma hepatocelular y tumor rabdoide maligno,
55 por ejemplo. La redirección de células efectoras a GPC3 usando CAR, por tanto, representa una plataforma robusta para abordar múltiples tipos de diana de tumores sólidos.

- Como la proteína GPC3 se expresa por varios tipos de tumores, este antígeno es una diana óptima para inmunoterapia adoptiva de linfocitos T basada en linfocitos T redirigidos por CAR GPC3. Además, la ausencia de expresión
60 significativa de GPC3 en tejidos normales resalta adicionalmente su relevancia para inmunoterapia.

- Otro aspecto descrito en el presente documento proporciona un método de inhibición de la proliferación y/o actividad de células GPC3 positivas, tales como células cancerosas, que comprende la etapa de poner en contacto las células con una cantidad terapéuticamente eficaz de inmunocitos que expresan un CAR dirigido a GPC3, por ejemplo, un CAR
65 específico de GPC3 como se proporciona en el presente documento, en el que el CAR no comprende un dominio dirigido a antígeno que es, o derivad de, anticuerpos 3E11, 2G9, 4G5, 3D8 o 2E10. En determinados aspectos

descritos en el presente documento, el cáncer es carcinoma hepatocelular, un hepatoblastoma, un sarcoma embrionario, un tumor rabdoide, un tumor de Wilms, un carcinoma escamocelular del pulmón, un liposarcoma, tumor del saco vitelino, coriocarcinoma, un carcinoma de mama, un carcinoma escamocelular de cabeza y cuello (HNSCC por sus siglas en inglés), o mesotelioma. En determinados aspectos descritos en el presente documento, el cáncer es un cáncer que expresa GPC3 que no es melanoma. En determinados aspectos descritos en el presente documento, el cáncer es un cáncer que expresa GPC3 que no es carcinoma hepatocelular. En algunos aspectos descritos en el presente documento, el contacto se realiza *in vitro*, en cultivo celular o *in vivo*. En casos particulares, el contacto se realiza *in vivo*, y los inmunocitos son células en un individuo, tales como linfocitos T. En casos particulares, los inmunocitos son autólogos o alogénicos con respecto al individuo. Un aspecto relacionado descrito en el presente documento proporciona un método de tratamiento de un individuo que tiene un cáncer que expresa GPC3, que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de inmunocitos que expresan un CAR específico de GPC3, por ejemplo, un CAR específico de GPC3 como se describe en el presente documento.

En aspectos particulares de los métodos descritos en el presente documento, los inmunocitos son linfocitos T, linfocitos NK, células dendríticas, linfocitos NKT, linfocitos MAIT, linfocitos $\gamma\delta$ -T o una mezcla de los mismos. Los linfocitos T pueden ser linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ o linfocitos Treg, linfocitos T Th1+, linfocitos T Th2+, linfocitos T Th17+, linfocitos T inespecíficos o una población de linfocitos T que comprende una combinación de cualquiera de los anteriores. En otros determinados aspectos descritos en el presente documento, los CAR específicos de GPC3 proporcionados en el presente documento se expresan en otros inmunocitos, incluyendo, aunque sin limitación, linfocitos NK, linfocitos NKT, linfocitos $\gamma\delta$ T o linfocitos T que reconocen antígenos específicos (por ejemplo, antígenos víricos u otros asociados a tumores) a través de su receptor natural de linfocitos T. Los inmunocitos pueden portar un polinucleótido que codifica el CAR, y el polinucleótido puede comprender además un gen suicida.

En determinados aspectos descritos en el presente documento, los CAR específicos de GPC3 transmiten señales para activar los inmunocitos a través de rutas de CD3zeta, CD28 y/o 4-1BB, aunque el dominio CAR intracelular podría modificarse fácilmente para incluir otros restos de señalización.

En métodos específicos de la divulgación, un individuo que ha recibido inmunocitos que expresan CAR GPC3, está recibiendo, o recibirá un tratamiento adicional contra el cáncer, tal como quimioterapia, inmunoterapia, radiación, cirugía, hormonoterapia o una combinación de los mismos.

Breve descripción de los dibujos

Para una comprensión más completa de la presente divulgación, ahora se hace referencia a las siguientes descripciones tomadas junto con los dibujos adjuntos, en los que:

la figura 1 muestra la estructura de GPC3;

la figura 2 ilustra el diseño de determinados CAR específicos de GPC3: el scFv específico de GPC3 se ligó con la bisagra y el dominio transmembranario CD28 a combinaciones de endodominios de señalización intracelular como se indica;

la figura 3 muestra la expresión de CAR GPC3 de linfocitos T: todos los CAR GPC3 (Gz, G28z, GBBz y G28BBz como se muestra en la figura 2) se expresaban altamente en linfocitos T como se detecta por análisis FACS. NT: linfocitos T no transducidos;

la figura 4 demuestra la citotoxicidad de linfocitos T CAR GPC3: el % de destrucción basado en la liberación de Cr⁵¹ se muestra a las relaciones indicadas de efector a diana para linfocitos T CAR GPC3 y linfocitos T no transducidos. NT: linfocito T no transducido. Dianas GPC3^{pos}: HepG2, HUH7 y Hep3B. Diana GPC3^{neg} A549;

la figura 5 muestra la liberación de IFN γ de linfocitos T CAR GPC3: se muestran los niveles de IFN γ en pg/ml de linfocitos T CAR GPC3 después de 24 horas de cocultivo con dianas GPC3^{pos} y GPC3^{neg}. NT: linfocito T no transducido. Dianas GPC3^{pos}: HepG2, HUH7 y Hep3B. Diana GPC3^{neg} A549;

la figura 6 muestra el análisis FACS con un panel de líneas celulares que expresan CAR GPC3;

figuras 7A-7C. La figura 7A ilustra una diversidad de casetes de expresión representativos para CAR GPC3. El scFv específico de GPC3 se ligó con la bisagra y el dominio transmembranario CD28 a combinaciones de endodominios de señalización intracelular como se indica. La figura 7B muestra un diagrama de FACS representativo para linfocitos T que expresan los diferentes casetes de expresión respectivos. La figura 7C demuestra las expresiones de CAR de células de múltiples donadores;

las figuras 8A-8E demuestran la citotoxicidad para una diversidad de linfocitos T CAR GPC3 que destruyeron una diversidad de células que expresan GPC3 (HepG2 en la figura 8A; HUH7 en la figura 8B; Hep3B en la figura 8C; G401 en la figura 8D; y G401 en la figura 8D), pero no las células de control que carecen de expresión de GPC3 (8E; A549);

las figuras 9A-9C muestran que los linfocitos T CAR GPC3 proliferan tras la exposición a células GPC3^{pos}. La figura 9A muestra el número absoluto de linfocitos T CAR GPC3. La figura 9B muestra la dilución en CFSE de linfocitos T CAR GPC3 3 días después de la simulación. La figura 9C demuestra la tinción 7-AAD en el día 4 después de la estimulación;

las figuras 10A-10O demuestran la secreción de citocinas por los linfocitos T CAR GPC3 en presencia de células GPC3^{pos}. Las figuras 10A, 10B, 10C, 10D y 10E muestran los resultados de la secreción de IL-2 tras cocultivo de los linfocitos T con células HepG2 (10A); células HUH7 (10B); células Hep3B (10C); células G401 (10D); y células A549 de control (10E). Las figuras 10F, 10G, 10H, 10I y 10J muestran los resultados de la secreción de IL10 en presencia de células HepG2 (10F); células HUH7 (10G); células Hep3B (10H); G401 (10I) y células A549 de control (10J). Las figuras 10K, 10L, 10M, 10N y 10O muestran los resultados de la secreción de IFN γ en presencia de células HepG2 (10K); células HUH7 (10L); células Hep3B (10M); G401 (10N) y células A549 de control (10O)

Las figuras 11A y 11B demuestran que los linfocitos T CAR GPC3 se expanden después de transferencia adoptiva *in vivo*, como se muestra por imágenes de bioluminiscencia (figura 11A) y su cuantificación (figura 11B).

Las figuras 12A-12C muestran que los linfocitos T CAR GPC3 tienen actividad antitumoral en xenoinjertos ilustrativos *in vivo*. La figura 12A demuestra la bioluminiscencia a lo largo del tiempo y su cuantificación se muestra en la figura 12B; la figura 12C muestra el porcentaje de supervivencia.

Las figuras 13A-13C muestran también que los linfocitos T CAR GPC3 tienen actividad antitumoral en xenoinjertos ilustrativos *in vivo*. Usando una dosis más pequeña de los linfocitos T CAR GPC3 en comparación con las figuras 12A-12C, la figura 13A demuestra la bioluminiscencia a lo largo del tiempo y su cuantificación se muestra en la figura 13B; la figura 13C muestra el porcentaje de supervivencia.

Las figuras 14A-14C muestran que los linfocitos T CAR GPC3 tienen actividad antitumoral en un segundo modelo de xenoinjerto ilustrativo *in vivo*. 14A demuestra la pauta de administración y la bioluminiscencia a lo largo del tiempo con su cuantificación que se muestra en la figura 14B; la figura 14C muestra el porcentaje de supervivencia.

Figura 15. Generación de linfocitos NKT CAR GPC3. Se aislaron NKT de PBMC de 3 donadores sanos, se estimularon con aGalCer, se transdujeron con vector retroviral de CAR GC33.CD28.4-1 BB.Z y se expandieron en cultivo con IL-2 durante 7 días. Las células resultantes se analizaron por FACS usando 6B11 (TCR α NKT), mAb anti-CD3 y anti-CAR

Descripción detallada de la divulgación

Como se usa en la presente memoria descriptiva, "un" o "uno/una" puede significar uno/una o más. Como se usa en la reivindicación o en las reivindicaciones, en el presente documento, cuando se usan junto con la expresión "que comprende", las palabras "un" o "uno/una" pueden significar uno/una o más de uno/una.

Como se usa en el presente documento, "otro" puede significar al menos un segundo o más. En aspectos específicos descritos en el presente documento, aspectos de la materia en cuestión descrita en el presente documento pueden "consistir esencialmente en" o "consistir en" uno o más elementos o etapas de la materia en cuestión, por ejemplo. Algunos aspectos de la materia en cuestión descrita en el presente documento pueden consistir en o consistir esencialmente en uno o más elementos, etapas del método y/o métodos de la materia en cuestión.

Se contempla que cualquier método o composición descrita en el presente documento puede implementarse con respecto a cualquier otro método o composición descrita en el presente documento.

La transferencia adoptiva de linfocitos T redirigidos por CAR representa un tratamiento útil para pacientes con neoplasias. En esta ocasión la aplicabilidad de esta estrategia se amplía a una amplia serie de tumores sólidos abordando el antígeno GPC3. Aspectos particulares de la divulgación incluyen métodos de tratamiento de cánceres que expresan GPC3. Los cánceres pueden ser de cualquier tipo, incluyendo de hígado, testicular, pulmón, ovario, cáncer de cabeza y cuello, mesotelioma, mama, glioblastoma, riñón, cerebro, piel, colon, próstata, pancreático, de cuello del útero, tiroideo, bazo o cáncer de hueso, por ejemplo. En casos particulares, el cáncer es hepatoblastoma, carcinoma hepatocelular, tumores rabdoideos malignos, tumores del saco vitelino, sarcoma indiferenciado del hígado, liposarcoma, tumor de Wilms o coriocarcinoma, aunque en casos específicos el cáncer no es carcinoma hepatocelular. En aspectos específicos de la divulgación, se emplea un scFv particular para GPC3.

Los indicios de tratamiento satisfactorio podrían ser, por ejemplo, reducción detectable en el crecimiento de un tumor (por ejemplo, como se observa por MRI o similares), o reducción en uno o más síntomas de un cáncer u otra afección médica que exprese GPC3, incluyendo que exprese de forma aberrante GPC3.

GPC3 también puede denominarse OCI-5, SDYS, GTR2-2, SGB, SGBS, SGBS1, MXR7 o DGSX, por ejemplo. Un ejemplo de una secuencia de nucleótidos humana de GPC3 es L47125 en GenBank® (con la secuencia proteínica

correspondiente en AAA98132 de GenBank®).

I. Receptores quiméricos de antígeno

- 5 La genomanipulación de linfocitos humanos u otros inmunocitos para expresar receptores quiméricos de antígeno (CAR) dirigidos a tumor puede producir células efectoras antitumorales que evitan los mecanismos de escape inmunitario tumoral que se deben a anomalías en el procesamiento y presentación de proteína-antígeno. Además, estos receptores transgénicos pueden dirigirse a antígenos asociados a tumor que no derivan de proteína. En determinados aspectos de la divulgación hay linfocitos T citotóxicos (CTL) que se modifican para que comprendan un
- 10 CAR dirigido a GPC3. En aspectos específicos descritos en el presente documento los CAR GPC3 no incluyen scFv derivados de 3E11, 2G9, 4G5, 3D8 o 2E10. En aspectos particulares descritos en el presente documento el scFv es GC33, y en determinados aspectos descritos en el presente documento el scFv comprende SEQ ID NO:1.

- 15 En casos particulares, los inmunocitos incluyen un receptor CAR que es quimérico, no natural y genomanipulado al menos en parte por la mano del hombre. En casos particulares, el receptor quimérico de antígeno (CAR) genomanipulado tiene uno, dos, tres, cuatro o más componentes, y en algunos aspectos descritos en el presente documento el uno o más componentes facilitan la dirección o unión del linfocito T a la célula cancerosa que comprende GPC3. En aspectos específicos descritos en el presente documento, el CAR comprende un anticuerpo contra GPC3, parte o la totalidad de un dominio citoplásmico de señalización, y/o parte o la totalidad de una o más moléculas
- 20 coestimulantes, por ejemplo, endodominios de moléculas coestimulantes. En aspectos específicos descritos en el presente documento, el anticuerpo es un scFv.

- En determinados aspectos descritos en el presente documento, un dominio citoplásmico de señalización, tal como los derivados de la cadena zeta del receptor de linfocitos T, se emplea como al menos parte del receptor quimérico para
- 25 producir señales estimulantes para la proliferación de linfocitos T y función efectora después de acoplamiento del receptor quimérico con el antígeno diana. Ejemplos incluirían, aunque sin limitación, endodominios de moléculas coestimulantes tales como CD28, CD27, 4-1BB, ICOS, OX40, una combinación de las mismas, o los componentes de señalización de receptores de citocinas tales como IL7 e IL15. En aspectos particulares descritos en el presente documento, las moléculas coestimulantes se emplean para potenciar la activación, proliferación y citotoxicidad de
- 30 linfocitos T producidos por el CAR GPC3 después del acoplamiento del antígeno. En aspectos específicos descritos en el presente documento, las moléculas coestimulantes son CD28, OX40 y 4-1BB, por ejemplo.

- El CAR puede ser de primera generación, segunda generación o tercera generación (CAR en que la señalización se proporciona por CD3 ζ junto con coestimulación proporcionada por CD28 y un receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), tal como 4-1BB u OX40), por ejemplo. El CAR puede ser específico para GPC3, y en algunos aspectos
- 35 descritos en el presente documento una célula que expresa el CAR específico de GPC3 también puede expresar un segundo CAR dirigido a otro antígeno, incluyendo uno o más CAR específicos para CD19, CD20, CD22, cadena kappa o ligera, CD30, CD33, CD123, CD38, ROR1, ErbB2, ErbB3/4, EGFR VIII, antígeno carcinoembrionario, EGP2, EGP40, mesotelina, TAG72, PSMA, ligandos de NKG2D, B7-H6, receptor α 2 de IL-13, receptor R α de IL-11, MUC1, MUC16,
- 40 CA9, GD2, GD3, HMW-MAA, CD171, Lewis Y, G250/CAIX, HLA-AI MAGE A1, HLA-A2 NY-ESO-1, PSC1, receptor- α de folato, CD44v7/8, 8H9, NCAM, receptores de VEGF, 5T4, AchR fetal, ligandos de NKG2D, HER2, BCMA o CD44v6, u otros antígenos asociados a tumor o mutaciones viables que se identifican a través de análisis genómico y/o estudios de expresión diferencial de tumores, por ejemplo.

- 45 En casos particulares, el CAR es específico para GPC3, y determinados aspectos de la presente divulgación proporcionan linfocitos T quiméricos específicos para GPC3 uniendo un dominio extracelular de unión a antígeno derivado de un anticuerpo específico de GPC3 a dominios citoplásmicos de señalización derivados de la cadena ζ del receptor de linfocitos T, opcionalmente con los endodominios de las moléculas coestimulantes ilustrativas CD28 y OX40, por ejemplo. Este CAR se expresa en células humanas, incluyendo linfocitos T humanos, y la dirección a cánceres GPC3 positivos se logra en el presente documento.
- 50

Un ejemplo de secuencia para un scFv, incluyendo el anticuerpo GC33 es de la siguiente manera (donde la región subrayada es la secuencia líder y la secuencia restante es el scFv):

MDWIWRILFLVGAATGAHSQVQLQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTDYEM
 HWVKQTPVHGLKWIGALDPKTGDTAYSQKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSA
 VYYCTRFYSYTYWGQGLTVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSDVVMVTQTPLSLPVSLGDQA
 SISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI
 SRVEAEDLGYYFCSQNTHPPTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:1)

55

Una secuencia de scFv sin la secuencia líder es de la siguiente manera:

QVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTDYEMHWVKQTPVHGLKWIGA
LDPKTGDTAYSQKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTRFYSYTYWGQG
TLVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSDVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTY
LHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQNT
HVPPTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:24)

La secuencia de nucleótidos para el scFv con el líder es de la siguiente manera (donde la región subrayada codifica la secuencia líder y la secuencia restante codifica el scFv):

5

ATGGATTGGATTGCGCATTCTGTTTCTGGTGGGAGCCGCAACCGGAGC
ACATAGTCAGGTCCAGCTGCAGCAGTCAGGAGCCGAACCTGGTGCGGCCCGGCGCAA
GTGTCAAACCTGTCATGCAAGGCCAGCGGGTATACCTTCACAGACTACGAGATGCACT
GGGTGAAACAGACCCCTGTGCACGGCCTGAAGTGGATCGGCGCTCTGGACCCAAAA
ACCGGGGATACAGCATATTCCCAGAAGTTTAAAGGAAAGGCCACTCTGACCGCTGA
CAAGAGCTCCTCTACTGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGACATCCGAAGATAGCG
CCGTGTACTATTGCACCCGCTTCTACTCCTATACATACTGGGGCCAGGGGACTCTGG
TGACCGTCTCTGCAGGAGGAGGAGGCTCTGGAGGAGGAGGGAGTGGAGGCGGGGG
AAGCGACGTGGTCATGACACAGACTCCACTGTCCCTGCCCCTGAGCCTGGGCGATC
AGGCTAGCATTTCCTGTCGAAGTTCACAGAGTCTGGTGCCTCAAACGGAAATACCT
ATCTGCATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCCAAACCTGCTGATCTATAAGG
TGAGCAACCGGTTCTCCGGGGTCCCTGACAGATTTTCTGGAAGTGGCTCAGGGACAG
ATTTCACTCTGAAAATTAGCAGAGTGGAGGCCGAAGATCTGGGCGTCTACTTTTGTA
GCCAGAATACCCACGTCCCACCAACATTCGGAAGCGGCACTAACTGGAAATCAAG
(SEQ ID NO:2)

Una secuencia de nucleótidos que codifica scFv sin la secuencia líder es de la siguiente manera:

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCAGGAGCCGAACTGGTGCGGCCCGGCGCAA
 GTGTCAAACCTGTCATGCAAGGCCAGCGGGTATACCTTCACAGACTACGAGATGCACT
 GGGTGAAACAGACCCCTGTGCACGGCCTGAAGTGGATCGGCGCTCTGGACCCAAAA
 ACCGGGGATACAGCATATTCCCAGAAGTTTAAAGGAAAGGCCACTCTGACCGCTGA
 CAAGAGCTCCTCTACTGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGACATCCGAAGATAGCG
 CCGTGTACTATTGCACCCGCTTCTACTCCTATACATACTGGGGCCAGGGGACTCTGG
 TGACCGTCTCTGCAGGAGGAGGAGGCTCTGGAGGAGGAGGGAGTGGAGGCGGGGG
 AAGCGACGTGGTCATGACACAGACTCCACTGTCCCTGCCCCGTGAGCCTGGGCGATC
 AGGCTAGCATTTCCTGTGCAAGTTCACAGAGTCTGGTGCACTCAAACGGAAATACCT
 ATCTGCATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCCAAACCTGCTGATCTATAAGG
 TGAGCAACCGGTTCTCCGGGGTCCCTGACAGATTTTCTGGAAGTGGCTCAGGGACAG
 ATTTCACTCTGAAAATTAGCAGAGTGGAGGCCGAAGATCTGGGCGTCTACTTTTGTA

 GCCAGAATACCCACGTCCCACCAACATTCGGAAGCGGCACTAAACTGGAAATCAAG
 (SEQ ID NO:25)

Un ejemplo de un CAR GPC3 que tiene el dominio transmembranario CD28 de (CAR scFvGC33.SH.CD28TM.zeta) es de la siguiente manera (en el que la región con subrayado sencillo es el líder y donde SH se refiere a una corta bisagra y TM se refiere a transmembrana):

MDWIWRILFLVGAATGAHSQVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTDY
 EMHWVKQTPVHGLKWIGALDPKTGDTAYSQKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSE
 DSAVYYCTRFYSYTYWGQGLTVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSDVVMQTPLSLPVSLG
 DQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDF
 TLKISRVEAEDLG VYFCSQNT HVPPTFGSGTKLEIKEPKSCDKTHTCPPCPDPKFWVLV
 VGGVLACYSLLVTVAFIIRVKESRSADAPAYOQONQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG
RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELOKD KMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTAT
KDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:3)

En SEQ ID NO:3, la región con subrayado doble es el dominio de señalización zeta; EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:4) es la bisagra corta; los aminoácidos conectores son DPK; y el dominio transmembranario CD28 es FWLVVVGGVLACYSLLVTVAFII (SEQ ID NO:5).

Una secuencia de CAR scFvGC33.SH.CD28TM.zeta que excluye el líder es de la siguiente manera:

QVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTDYEMHWVKQTPVHGLKWIGA
 LDPKTGDTAYSQKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTRFYSYTYWGQG
 TLTVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSDVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTY
 LHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLG VYFCSQNT
 HVPPTFGSGTKLEIKEPKSCDKTHTCPPCPDPKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIRVK
ESRSADAPAYOQONQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN
ELQKD KMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ
 ID NO:26)

Una secuencia de nucleótidos correspondiente para CAR scFvGC33.SH.CD28TM.zeta es de la siguiente manera (en

la que la región con subrayado sencillo es el líder):

ATGGATTGGATTGCGCATTCTGTTTCTGGTGGGAGCCGCAACCGGAGC
ACATAGTCAGGTCCAGCTGCAGCAGTCAGGAGCCGAACTGGTGCGGCCCGGCGCAA
 GTGTCAAACGTGTCATGCAAGGCCAGCGGGTATACCTTCACAGACTACGAGATGCACT
 GGGTGAAACAGACCCCTGTGCACGGCCTGAAGTGGATCGGCGCTCTGGACCCAAAA
 ACCGGGGATACAGCATATTCCCAGAAGTTTAAAGGAAAGGCCACTCTGACCGCTGA
 CAAGAGCTCCTCTACTGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGACATCCGAAGATAGCG
 CCGTGTACTATTGCACCCGCTTCTACTCCTATACATACTGGGGCCAGGGGACTCTGG
 TGACCGTCTCTGCAGGAGGAGGAGGCTCTGGAGGAGGAGGGAGTGGAGGCGGGGG
 AAGCGACGTGGTCATGACACAGACTCCACTGTCCCTGCCCCTGAGCCTGGGCGATC
 AGGCTAGCATTTCTGTGCAAGTTCACAGAGTCTGGTGCCTCAAACGGAAATACCT
 ATCTGCATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCCAAACCTGCTGATCTATAAGG
 TGAGCAACCGGTTCTCCGGGGTCCCTGACAGATTTTCTGGAAGTGGCTCAGGGACAG
 ATTTCACTCTGAAAATTAGCAGAGTGGAGGGCCGAAGATCTGGGCGTCTACTTTTGTA
 GCCAGAATACCCACGTCCACCAACATTCGGAAGCGGCACTAACTGGAAATCAAG
 GAGCCCAAATCTTGTGACAAACTCACACATGCCACCGTGCCCGGATCCGAAAGA
 TCCCAAATTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTA
 GTAACAGTGGCCTTTATTATTAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGC
GTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGG
AGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCG
AGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGG
CGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCA
CGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCA
CATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO:6)

- 5 En SEQ ID NO:6, la región con subrayado doble es el dominio de señalización zeta; la región de bisagra corta es GAGCCCAAATCTTGTGACAAACTCACACATGCCACCGTGCCCGGATCCGAAA (SEQ ID NO:7); la región conectora es GATCCCAA (SEQ ID NO:8); y el dominio transmembranario CD28 es

TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACA
 GTGGCCTTTATTATT (SEQ ID NO:9).

10

Una secuencia polinucleotídica de CAR scFvGC33.SH.CD28TM.zeta sin el líder es de la siguiente manera:

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCAGGAGCCGAACCTGGTGC GGCCCCGGCGCAA
 GTGTCAAACCTGTCATGCAAGGCCAGCGGGTATACCTTCACAGACTACGAGATGCACT
 GGGTGAAACAGACCCCTGTGCACGGCCTGAAGTGGATCGGCGCTCTGGACCCAAAA
 ACCGGGGATACAGCATATTCCCAGAAGTTTAAAGGAAAGGCCACTCTGACCGCTGA
 CAAGAGCTCCTCTACTGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGACATCCGAAGATAGCG
 CCGTGTACTATTGCACCCGCTTCTACTCCTATACATACTGGGGCCAGGGGACTCTGG
 TGACCGTCTCTGCAGGAGGAGGAGGCTCTGGAGGAGGAGGGAGTGGAGGCGGGGG
 AAGCGACGTGGTCATGACACAGACTCCACTGTCCCTGCCCCTGAGCCTGGGCGATC
 AGGCTAGCATTTTCTGTGCAAGTTCACAGAGTCTGGTGCCTCAAACGGAAATACCT
 ATCTGCATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCCAAACCTGCTGATCTATAAGG
 TGAGCAACCGGTTCTCCGGGGTCCCTGACAGATTTTCTGGAAGTGGCTCAGGGACAG
 ATTTCACTCTGAAAATTAGCAGAGTGGAGGCCGAAGATCTGGGCGTCTACTTTTGTA
 GCCAGAATACCCACGTCCACCAACATTCGGAAGCGGCACTAAACTGGAAATCAAG
 GAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCGGATCCGAAAGA
 TCCCAAATTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTA
 GTAACAGTGGCCTTTATTATTAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGC
GTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGG
AGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCG
AGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGG
CGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCA
CGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTCA
CATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO:27)

Un ejemplo de un CAR GPC3 que tiene el dominio transmembranario CD28 y de señalización (CAR scFvGC33.SH.CD28.zeta) es de la siguiente manera (en el que la región con subrayado sencillo es el líder):

5

MDWIWRILFLVGAATGAHSQVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTDY
 EMHWVKQTPVHGLKWIGALDPKTGDTAYSQKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSE
 DSAVYYCTRFYSYTYWGQGLVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSDVVMQTPLSLPVSLG
 DQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSQVPDRFSGSGSTDF
 TLKISRVEAEDLGVIYFCSQNTHPPTFGSGTKLEIKPKSCDKTHTCPPCPDPKFWVLVV
 VGGVLACYSLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAA
 YRSRVKFSRSADAPAYQQGONQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPGEMGGKPRRKNP
QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP
R (SEQ ID NO:10)

En SEQ ID NO:10, la región con subrayado doble es el dominio de señalización zeta; SEQ ID NO:4 es la bisagra corta; los aminoácidos conectores son DPK; y el dominio transmembranario CD28 y de señalización es

10

FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYA
PPRDFAAAYRS (SEQ ID NO:11).

Una secuencia polipeptídica de CAR scFvGC33.SH.CD28.zeta sin el líder es de la siguiente manera:

5

QVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTDYEMHWVKQTPVHGLKWIGA
LDPKTDGTAYSQKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTRFYSYTYWGQG
TLVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSDVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTY
LHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQNT
HVPPTFGSGTKLEIKEPKSCDKTHTCPPCPDPKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV
RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAAYRSSRVKFSRSADAPAYOQGO
NQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPOEGLYNELQDKMAEAYSEI
GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:28)

Una secuencia de nucleótidos correspondiente para CAR scFvGC33.SH.CD28.zeta es de la siguiente manera (donde la región con subrayado sencillo es el líder):

10

ATGGATTGGATTGGCGCATTCTGTTTCTGGTGGGAGCCGCAACCGGAGC
ACATAGTCAGGTCCAGCTGCAGCAGTCAGGAGCCGAACCTGGTGCGGCCCGGCGCAA
GTGTCAAACGTGCATGCAAGGCCAGCGGGTATACCTTCACAGACTACGAGATGCACT
GGGTGAAACAGACCCCTGTGCACGGCCTGAAGTGGATCGGCGCTCTGGACCCAAAA
ACCGGGGATACAGCATATTCCCAGAAGTTTAAAGGAAAGGCCACTCTGACCGCTGA
CAAGAGCTCCTCTACTGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGACATCCGAAGATAGCG
CCGTGTACTATTGCACCCGCTTCTACTCCTATACATACTGGGGCCAGGGGACTCTGG
TGACCGTCTCTGCAGGAGGAGGAGGCTCTGGAGGAGGAGGGAGTGAGGCGGGGG
AAGCGACGTGGTCATGACACAGACTCCACTGTCCCTGCCCCTGAGCCTGGGCGATC
AGGCTAGCATTTCCTGTGCAAGTTCACAGAGTCTGGTGCACTCAAACGGAAATACCT
ATCTGCATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCCAAACCTGCTGATCTATAAGG

TGAGCAACCGGTTCTCCGGGGTCCCTGACAGATTTTCTGGAAGTGGCTCAGGGACAG
 ATTTCACTCTGAAAATTAGCAGAGTGAGGCGGAAGATCTGGGCGTCTACTTTTGTA
 GCCAGAATACCCACGTCCCACCAACATTCGGAAGCGGCACTAAACTGGAAATCAAG
 GAGCCCAAATCTTGTGACAAACTCACACATGCCACCGTGCCCGGATCCGAAAGA
 TCCCAAATTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTA
 GTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCAC
 AGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCA
 GCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAG
GAGCGCAGACGCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCA
ATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCT
GAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAAC
TGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCG
CCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGG
ACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCTCGC (SEQ ID NO:12)

En SEQ ID NO:12, la región con subrayado doble es el dominio de señalización zeta; SEQ ID NO:7 es la región de bisagra corta; la región conectora es SEQ ID NO:8; y el dominio transmembranario CD28 y de señalización es

5

TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACA
 GTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGAC
 TACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTAT
 GCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC (SEQ ID NO:13).

Una secuencia polinucleotídica de CAR scFvGC33.SH.CD28.zeta sin la secuencia líder es de la siguiente manera:

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCAGGAGCCGAAGTGGTGCGGGCCCGGCGCAA
 GTGTCAAAGTGTGATGCAAGGCCAGCGGGTATACCTTCACAGACTACGAGATGCACT
 GGGTGAAACAGACCCCTGTGCACGGCCTGAAGTGGATCGGCGCTCTGGACCCAAAA
 ACCGGGGATACAGCATATTCCCAGAAGTTTAAAGGAAAGGCCACTCTGACCGCTGA
 CAAGAGCTCCTCTACTGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGACATCCGAAGATAGCG
 CCGTGTACTATTGCACCCGCTTCTACTCCTATACATACTGGGGCCAGGGGACTCTGG
 TGACCGTCTCTGCAGGAGGAGGAGGCTCTGGAGGAGGAGGGAGTGGAGGCGGGGG
 AAGCGACGTGGTCATGACACAGACTCCACTGTCCCTGCCCGTGAGCCTGGGCGATC

10

AGGCTAGCATTTCCTGTCGAAGTTCACAGAGTCTGGTGCACCTCAAACGGAAATACCT
 ATCTGCATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCCAAAGTCTGATCTATAAGG
 TGAGCAACCGGTTCTCCGGGGTCCCTGACAGATTTTCTGGAAGTGGCTCAGGGACAG
 ATTTCACTCTGAAAATTAGCAGAGTGGAGGCCGAAGATCTGGGCGTCTACTTTTGTA
 GCCAGAATACCCACGTCCCAACACATTCGGAAGCGGCACTAACTGGAAATCAAG
 GAGCCCAAATCTTGTGACAAAACATCACACATGCCACCGTGCCCGGATCCGAAAGA
 TCCCAAATTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTA
 GTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCAC
 AGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCA
 GCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAG
GAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCA
ATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCT
GAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAAC
TGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCG
CCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGG
ACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO:29)

Un ejemplo de un CAR GPC3 que tiene el dominio transmembranario CD28 y el endodominio 41BB (CAR scFvGC33.SH.CD28TM.41BB.zeta) es de la siguiente manera (donde la región con subrayado sencillo es la secuencia líder):

MDWIWRILFLVGAATGAHSQVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTDY
 EMHWVKQTPVHGLKWIGALDPKTGDTAYSQKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSE
 DSAVYYCTRFYSYTYWGQGLVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSDVVMQTPLSLPVS LG
 DQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRFSGV PDRFSGSGSGTDF
 TLKISRVEAEDLG VYFCSQNTHPPTFGSGTKLEIKEPKSCDKTHTCPPCPDPKFWVLVV
 VGGVLACYSLLVTVAFIIKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEG
LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
 (SEQ ID NO:14)

En SEQ ID NO:14, la región con subrayado doble es el dominio de señalización zeta; SEQ ID NO:4 es la bisagra corta; DPK es los aminoácidos conectores; el dominio transmembranario CD28 es SEQ ID NO:5; y el endodominio 41BB es KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL (SEQ ID NO:15).

Una secuencia polipeptídica de CAR scFvGC33.SH.CD28TM.41BB.zeta sin el líder es de la siguiente manera:

QVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTDYEMHWVKQTPVHGLKWIGA
LDPKTDGTAYSQKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTRFYSYTYWGQG
TLVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSDVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTY
LHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDFRSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVIYFCSQNT
HVPPTFGSGTKLEIKEPKSCDKTHTCPPCPDPKFWVLVVGGLVACYSLLVTVAFIIKRG
RKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQOGQNQL
YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEGGKPRRKNPQEGLYNELOKDKMAEAYSEIGMK
GERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:30)

Una secuencia de nucleótidos correspondiente para CAR scFvGC33.SH.CD28TM.41BB.zeta es de la siguiente manera (donde el subrayado sencillo es la secuencia líder):

5

ATGGATTGGATTGGCGCATTCTGTTTCTGGTGGGAGCCGCAACCGGAGC
ACATAGTCAGGTCCAGCTGCAGCAGTCAGGAGCCGAAGTGGTGCGGCCCGGCGCAA
GTGTCAAAGTGTGATGCAAGGCCAGCGGGTATACCTTCACAGACTACGAGATGCACT
GGGTGAAACAGACCCCTGTGCACGGCCTGAAGTGGATCGGCGCTCTGGACCCAAAA
ACCGGGGATACAGCATATTCCCAGAAGTTTAAAGGAAAGGCCACTCTGACCGCTGA
CAAGAGCTCCTCTACTGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGACATCCGAAGATAGCG
CCGTGTACTATTGCACCCGCTTCTACTCCTATACATACTGGGGCCAGGGGACTCTGG
TGACCGTCTCTGCAGGAGGAGGAGGCTCTGGAGGAGGAGGGAGTGGAGGCGGGGG
AAGCGACGTGGTCATGACACAGACTCCACTGTCCCTGCCCCGTGAGCCTGGGCGATC
AGGCTAGCATTTCTGTGCAAGTTCACAGAGTCTGGTGCCTCAAACGGAAATACCT
ATCTGCATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCCAAAGTGTGATCTATAAGG
TGAGCAACCGGTTCTCCGGGGTCCCTGACAGATTTTCTGGAAGTGGCTCAGGGACAG
ATTTCACTCTGAAAATTAGCAGAGTGGAGGCCGAAGATCTGGGCGTCTACTTTTGTA
GCCAGAATACCCACGTCCACCAACATTCGGAAGCGGCACTAACTGGAAATCAAG
GAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCGGATCCGAAAGA
TCCCAAATTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTA
GTAACAGTGGCCTTTATTATTAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAA

CAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCG
ATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGC
GCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCT
AGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAG
ATGGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGC
AGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCG
GAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACA
CCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO:16)

10 En SEQ ID NO:16, el subrayado doble es el dominio de señalización zeta; la región de bisagra corta es SEQ ID NO:7; los aminoácidos conectores son SEQ ID NO:8; el dominio transmembranario CD28 es SEQ ID NO:9; y el dominio 41BB es

AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTATGAGACCAGT
ACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCAGAGAAGAAGAAG
GAGGATGTGAACTG (SEQ ID NO:17).

- 5 Una secuencia polinucleotídica de CAR scFvGC33.SH.CD28TM.41BB.zeta que excluye la secuencia líder es de la siguiente manera:

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCAGGAGCCGAACTGGTGC GGCCCGGCGCAA
GTGTCAAACCTGTCATGCAAGGCCAGCGGGTATACCTTCACAGACTACGAGATGCACT
GGGTGAAACAGACCCCTGTGCACGGCCTGAAGTGGATCGGCGCTCTGGACCCAAAA
ACCGGGGATACAGCATATTCCCAGAAGTTTAAAGGAAAGGCCACTCTGACCGCTGA
CAAGAGCTCCTCTACTGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGACATCCGAAGATAGCG
CCGTGTACTATTGCACCCGCTTCTACTCCTATACATACTGGGGCCAGGGGACTCTGG
TGACCGTCTCTGCAGGAGGAGGAGGCTCTGGAGGAGGAGGGAGTGGAGGCGGGGG
AAGCGACGTGGTCATGACACAGACTCCACTGTCCCTGCCCCTGAGCCTGGGCGATC
AGGCTAGCATTTCTGTGCAAGTTCACAGAGTCTGGTGCCTCAAACGGAAATACCT
ATCTGCATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCCAAACCTGCTGATCTATAAGG
TGAGCAACCGGTTCTCCGGGGTCCCTGACAGATTTTCTGGAAGTGGCTCAGGGACAG
ATTTCACTCTGAAAATTAGCAGAGTGGAGGCCGAAGATCTGGGCGTCTACTTTTGTA
GCCAGAATACCCACGTCCACCAACATTCGGAAGCGGCACTAACTGGAAATCAAG
GAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCGGATCCGAAAGA
TCCCAAATTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTA

GTAACAGTGGCCTTTATTATTAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAA
CAACCATTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCG
ATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGC
GCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCT
AGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAG
ATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGC
AGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCG
GAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACA
CCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO:31)

- 10 Un ejemplo de un CAR GPC3 que tiene el dominio transmembranario CD28 y el endodominio y el endodominio 41BB (CAR scFvGC33.SH.CD28.41BB.zeta) es de la siguiente manera (donde la región con subrayado sencillo es la secuencia líder):

MDWIWRILFLVGAATGAHSQVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTDY
 EMHWVKQTPVHGLKWIGALDPKTGDTAYSQKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSE
 DSAVYYCTRFYSYTYWGQGLTVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSDVVMQTPLSLPVSLG
 DQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDF
 TLKISRVEAEDLGVIYFCSQNTHPPTFGSGTKLEIKEPKSCDKTHTCPPCPDPKFWVLVV
 VGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAA
 YRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQ
QGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELOKDKMAEA
YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:18)

5 En SEQ ID NO:18, el dominio de señalización zeta tiene subrayado doble, la región de bisagra corta es SEQ ID NO:4; el dominio transmembranario CD28 y el endodominio es SEQ ID NO:11; los aminoácidos conectores son DPK; y el endodominio 41BB es SEQ ID NO:15.

Una secuencia polipeptídica de CAR scFvGC33.SH.CD28.41BB.zeta es de la siguiente manera:

QVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTDYEMHWVKQTPVHGLKWIGA
 LDPKTGDTAYSQKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTRFYSYTYWGQG
 TLTVSAGGGGSGGGGSGGGGSDVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTY
 LHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVIYFCSQNT
 HVPPTFGSGTKLEIKEPKSCDKTHTCPPCPDPKFWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV
 RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSKRGRKKLLYIFKQPFMRP
 VQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDV
LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELOKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLY
QGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:32)

10 Una secuencia de nucleótidos correspondiente para CAR scFvGC33.SH.CD28.41BB.zeta es de la siguiente manera, en la que la región con subrayado sencillo es la secuencia líder:

ATGGATTGGATTTGGCGCATTCTGTTTCTGGTGGGAGCCGCAACCGGAGC
ACATAGTCAGGTCCAGCTGCAGCAGTCAGGAGCCGAACCTGGTGC GGCCCCGGCGCAA
 GTGTCAAACCTGTCATGCAAGGCCAGCGGGTATACCTTCACAGACTACGAGATGCACT
 GGGTGAAACAGACCCCTGTGCACGGCCTGAAGTGGATCGGCGCTCTGGACCCAAAA
 ACCGGGGATACAGCATATTCCCAGAAGTTTAAAGGAAAGGCCACTCTGACCGCTGA
 CAAGAGCTCCTCTACTGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGACATCCGAAGATAGCG
 CCGTGTACTATTGCACCCGCTTCTACTCCTATACATACTGGGGCCAGGGGACTCTGG
 TGACCGTCTCTGCAGGAGGAGGAGGCTCTGGAGGAGGAGGGAGTGGAGGCGGGGG
 AAGCGACGTGGTCATGACACAGACTCCACTGTCCCTGCCCCGTGAGCCTGGGCGATC
 AGGCTAGCATTTTCTGTGCAAGTTCACAGAGTCTGGTGC ACTCAAACGGAAATACCT
 ATCTGCATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCCAAACCTGCTGATCTATAAGG
 TGAGCAACCGGTTCTCCGGGGTCCCTGACAGATTTTCTGGAAGTGGCTCAGGGACAG
 ATTTCACTCTGAAAATTAGCAGAGTGGAGGCCGAAGATCTGGGCGTCTACTTTTGTA
 GCCAGAATACCCACGTCCCACCAACATTTCGAAGCGGCACTAAACTGGAAATCAAG
 GAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCGGATCCGAAAGA
 TCCCAAATTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTA
 GTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCAC
 AGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCA
 GCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAAACGGGGCAGAAAGA
 AACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGG
 AAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGA
GTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCT
CTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGAC
GTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGG
CCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGA
TGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGT

ACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

(SEQ ID NO:19).

- 5 En SEQ ID NO:19, el subrayado doble es el dominio de señalización zeta; la región de bisagra corta es SEQ ID NO:7; la región conectora es SEQ ID NO:8; el dominio transmembranario CD28 y el endodominio es SEQ ID NO:13; y el endodominio 41BB es SEQ ID NO:17.

Una secuencia polinucleotídica de CAR scFvGC33.SH.CD28.41BB.zeta que excluye el líder es de la siguiente manera:

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCAGGAGCCGAACTGGTGCGGCCCCGGCGCAA
 GTGTCAAACGTGTCATGCAAGGCCAGCGGGTATACCTTCACAGACTACGAGATGCACT
 GGGTGAAACAGACCCCTGTGCACGGCCTGAAGTGGATCGGCGCTCTGGACCCAAAA
 ACCGGGGATACAGCATATTCCCAGAAGTTTAAAGGAAAGGCCACTCTGACCGCTGA
 CAAGAGCTCCTCTACTGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGACATCCGAAGATAGCG
 CCGTGTACTATTGCACCCGCTTCTACTCCTATACATACTGGGGCCAGGGGACTCTGG
 TGACCGTCTCTGCAGGAGGAGGAGGCTCTGGAGGAGGAGGGAGTGGAGGCGGGGG
 AAGCGACGTGGTCATGACACAGACTCCACTGTCCCTGCCCGTGAGCCTGGGCGATC
 AGGCTAGCATTTCTGTGCAAGTTCACAGAGTCTGGTGCACTCAAACGGAAATACCT
 ATCTGCATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCCAAACCTGCTGATCTATAAGG
 TGAGCAACCGGTTCTCCGGGGTCCCTGACAGATTTTCTGGAAGTGGCTCAGGGACAG
 ATTTCACTCTGAAAATTAGCAGAGTGGAGGCCGAAGATCTGGGCGTCTACTTTTGTA
 GCCAGAATACCCACGTCCACCAACATTCGGAAGCGGCACTAACTGGAAATCAAG
 GAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCGGATCCGAAAGA
 TCCCAAATTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTA
 GTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCAC
 AGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCCCACCCGCAAGCATTACCA
 GCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAAACGGGGCAGAAAGA
 AACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGG
 AAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGA
GTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCT
CTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGAC
GTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGG
CCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGA
TGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGT
ACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC
 (SEQ ID NO:33)

En aspectos particulares descritos en el presente documento, se emplean determinadas secuencias V_H y V_L en las composiciones GC33 de la divulgación, tal como sigue:

5

Secuencias de nucleótidos:

V_H

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCAGGAGCCGAACTGGTGCGGCCCGGCGCAA
 GTGTCAAACGTGTCATGCAAGGCCAGCGGGTATACCTTCACAGACTACGAGATGCACT
 GGGTGAAACAGACCCCTGTGCACGGCCTGAAGTGGATCGGCGCTCTGGACCCAAAA
 ACCGGGGATACAGCATATTCCCAGAAGTTTAAAGGAAAGGCCACTCTGACCGCTGA
 CAAGAGCTCCTCTACTGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGACATCCGAAGATAGCG
 CCGTGTACTATTGCACCCGCTTCTACTCCTATACATACTGGGGCCAGGGGACTCTGG
 TGACCGTCTCTGC (SEQ ID NO:20)

V_L

GACGTGGTCATGACACAGACTCCACTGTCCCTGCCCCGTGAGCCTGGGCGA
 TCAGGCTAGCATTTCCTGTGCAAGTTCACAGAGTCTGGTGCCTCAAACGGAAATAC
 CTATCTGCATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCCAAACCTGCTGATCTATAA
 GGTGAGCAACCGGTTCTCCGGGGTCCCTGACAGATTTTCTGGAAGTGGCTCAGGGAC
 AGATTTCACTCTGAAAATTAGCAGAGTGGAGGCCGAAGATCTGGGCGTCTACTTTTG
 TAGCCAGAATACCCACGTCCACCAACATTCCGAAGCGGCACTAAACTGGAAATCA
 A (SEQ ID NO:21)

Secuencias de aminoácidos

V_H

QVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTDYEMHWVKQTPVHGLKWIGA
 LDPKTDGTAYSQKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTRFYSYTYWGQG
 TLVTVSA (SEQ ID NO:22)

V_L

DVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLL
 IYKVSNRFSGVPRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQNTHPPTFGSGTKLEIK
 (SEQ ID NO:23)

5

En aspectos específicos descritos en el presente documento, el CAR específico de GPC3 comprende secuencias que son un 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 o 99 % idénticas a al menos una de SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 o 33.

10

II. Células

Las células de la divulgación incluyen inmunocitos que expresan un CAR GPC3. En otro aspecto, en el presente documento se proporcionan inmunocitos que expresan un CAR específico de GPC3 descrito en el presente documento. En determinados aspectos descritos en el presente documento, los inmunocitos son linfocitos T, linfocitos NK, células dendríticas, linfocitos NKT o una mezcla de los mismos. En aspectos específicos descritos en el presente documento, en que los inmunocitos son linfocitos T, los linfocitos T pueden ser linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, linfocitos Treg, linfocitos T Th1+, linfocitos T Th2+, linfocitos T Th17+, linfocitos T inespecíficos o una población de linfocitos T que comprende una combinación de cualquiera de los anteriores. En otros determinados aspectos descritos en el presente documento, los CAR específicos de GLC3 descritos en el presente documento se expresan en otros inmunocitos, incluyendo, aunque sin limitación, linfocitos NK, linfocitos NKT, linfocitos γδ T o linfocitos T que reconocen

15

20

antígenos específicos (por ejemplo, antígenos víricos u otros asociados a tumores) a través de su receptor natural de linfocitos T.

Como se usan en el presente documento, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" pueden usarse indistintamente. Todas estas expresiones también incluyen su descendencia, que es todas las generaciones posteriores. Se entiende que toda la descendencia puede no ser idéntica debido a mutaciones deliberadas o accidentales. En el contexto de la expresión de una secuencia de ácido nucleico heteróloga, "célula hospedadora" se refiere a una célula eucariota que puede replicar un vector y/o expresar un gen heterólogo codificado por un vector. Una célula hospedadora puede usarse, y se ha usado, como destinataria de vectores. Una célula hospedadora puede "transfectarse" o "transformarse", lo que se refiere a un proceso por el que se transfiere o se introduce un ácido nucleico exógeno en la célula hospedadora. Una célula transformada incluye la célula en cuestión primaria y su descendencia. Como se usan en el presente documento, los términos células o células hospedadoras "genomanipuladas" y "recombinantes" pretenden referirse a una célula en que una secuencia de ácido nucleico exógena, tal como, por ejemplo, un vector, se ha introducido. Por lo tanto, las células recombinantes son distinguibles de las células de origen natural que no contienen un ácido nucleico introducido de manera recombinante. En aspectos de la divulgación, una célula hospedadora es un linfocito T, incluyendo un linfocito T citotóxico (también conocido como TC, linfocito-T citotóxico, CTL, linfocito T-citolítico, linfocito T citolítico, linfocito T CD8+ o linfocito citolítico T); los linfocitos NK y linfocitos NKT también se incluyen en la divulgación.

En determinados aspectos descritos en el presente documento, se contempla que los ARN o secuencias proteínicas pueden coexpresarse con otros ARN o secuencias proteínicas en la misma célula, tal como el mismo CTL. La coexpresión puede conseguirse cotransfectando el CTL con dos o más vectores recombinantes distintos. Como alternativa, puede construirse un vector recombinante sencillo para que incluya múltiples regiones codificantes distintas de ARNA, que podrían expresarse después en CTL transfectados con el vector sencillo.

Algunos vectores pueden emplear secuencias de control que les permiten replicarse y/o expresarse tanto en células procariotas como en células eucariotas. Un experto en la materia comprendería además las condiciones en las que incubar todas las células hospedadoras descritas anteriormente para mantenerlas y permitir la replicación de un vector. También se comprenden y conocen técnicas y condiciones que permitirían la producción a gran escala de vectores, así como la producción de los ácidos nucleicos codificados por vectores y sus polipéptidos, proteínas o péptidos análogos.

Las células pueden ser células autólogas, células singénicas, células alogénicas e incluso, en algunos casos, células xenogénicas.

En muchas situaciones, se puede desear poder destruir los CTL modificados, cuando se desea terminar el tratamiento, las células se han vuelto neoplásicas, en investigación cuando la ausencia de las células después de su presencia es de interés, u otro acontecimiento, por ejemplo. Para este fin, se puede proporcionar la expresión de determinados productos génicos en que se pueden destruir las células modificadas en condiciones controladas, tales como genes suicidas inducibles. En determinados aspectos descritos en el presente documento, el gen suicida es caspasa-9 o timidina cinasa de HSV, por ejemplo. Un gen suicida inducible puede usarse para reducir el riesgo de toxicidad directa y/o proliferación incontrolada, por ejemplo. En aspectos específicos, el gen suicida no es inmunógeno para el hospedador que porta el polinucleótido o célula. Un determinado ejemplo de un gen suicida que puede usarse es caspasa-9 o caspasa-8 o citosina desaminasa. La caspasa-9 se puede activar usando un inductor químico específico de dimerización (CID), por ejemplo. Pueden utilizarse sistemas suicidas basados en timidina cinasa.

III. Ejemplificaciones ilustrativas

A modo de ilustración, los individuos con cáncer o en riesgo de cáncer (tales como los que tienen uno o más factores de riesgo) o sospechosos de tener cáncer pueden tratarse de la siguiente manera. Pueden administrarse linfocitos efectores tales como CTL modificados como se describe en el presente documento al individuo y retenerse durante periodos prolongados de tiempo. El individuo puede recibir una o más administraciones de las células, y las administraciones pueden producirse o no junto con uno o más tratamientos contra el cáncer distintos. En algunos aspectos descritos en el presente documento, las células modificadas genéticamente se encapsulan para inhibir el reconocimiento inmunitario y se colocan en el sitio del tumor.

En casos particulares en el presente documento, a un individuo se le proporcionan CTL terapéuticos modificados para que comprendan un CAR específico de GPC3 además de otros tipos de células terapéuticas. Las células pueden administrarse al mismo tiempo o en diferentes momentos. Las células pueden administrarse en la misma formulación o en formulaciones separadas. Las células pueden proporcionarse al individuo en vías de administración separadas. Las células pueden administrarse por inyección en el sitio de un tumor o por vía intravenosa u oral, por ejemplo. Las células pueden administrarse de forma sistémica o local. Las vías de administración habituales para dichas composiciones son conocidas en la técnica.

IV. Introducción de construcciones en inmunocitos

Pueden introducirse vectores de expresión que codifican los CAR GPC3 en células tales como inmunocitos, incluyendo inmunocitos efectores tales como CTL, como una molécula o construcción de ADN, donde puede haber al menos un marcador que permitirá la selección de células hospedadoras que contienen la una o más construcciones. Las construcciones pueden prepararse de maneras convencionales, donde los genes y regiones reguladoras pueden aislarse, según lo apropiado, ligarse, clonarse en un hospedador de clonación apropiado, analizarse por restricción o secuenciación, u otro medio conveniente. Particularmente, usando PCR, pueden aislarse fragmentos individuales que incluyen la totalidad o partes de una unidad funcional, donde pueden introducirse una o más mutaciones usando "reparación con cebador", ligamiento, mutagénesis *in vitro*, etc., según lo apropiado. La una o más construcciones, una vez completadas y una vez se ha demostrado que tienen las secuencias apropiadas, pueden introducirse entonces en el CTL por cualquier medio conveniente. Las construcciones pueden integrarse y empaquetarse en genomas víricos defectuosos, que no se replican como adenovirus, virus adenoasociado (AAV) o virus del herpes simple (HSV) u otros, incluyendo vectores retrovíricos, para su infección o transducción en células. Las construcciones pueden incluir secuencias víricas para transfección, si se desea. Como alternativa, la construcción puede introducirse por fusión, electroporación, biolística, transfección, lipofección o similares. Las células hospedadoras pueden hacerse crecer y expandirse en cultivo antes de la introducción en la una o más construcciones, seguido del tratamiento apropiado para la introducción de la una o más construcciones y la integración de la una o más construcciones. Las células entonces se expanden y se criban basándose en un marcador presente en la construcción. Diversos marcadores que pueden usarse satisfactoriamente incluyen hprt, resistencia a neomicina, timidina cinasa, resistencia a higromicina, etc.

En algunos casos, se puede tener un sitio diana para recombinación homóloga, donde se desea que se integre una construcción en un locus particular. Por ejemplo, se puede inactivar un gen endógeno y reemplazarlo (en el mismo locus o en otra parte) con el gen codificado por la construcción usando materiales y métodos que son conocidos en la técnica para recombinación homóloga. Para recombinación homóloga, se pueden usarse vectores OMEGA u O. Véase, por ejemplo, Thomas y Capecchi, *Cell* (1987) 51, 503-512; Mansour, *et al.*, *Nature* (1988) 336, 348-352; y Joyner, *et al.*, *Nature* (1989) 338, 153-156.

Los vectores que contienen elementos útiles tales como orígenes de replicación bacterianos o de levadura, marcadores de selección y/o amplificables, elementos promotores/potenciadores para la expresión en procariotas o eucariotas, etc. que pueden usarse para preparar reservas de ADN de construcción y para realizar transfecciones son bien conocidos en la técnica, y muchos están disponibles en el mercado.

V. Administración de células

Los linfocitos T ilustrativos que se han modificado con la una o más construcciones se hacen crecer entonces en cultivo en condiciones selectivas y las células que se seleccionan por tener la construcción pueden expandirse entonces y analizarse adicionalmente, usando, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa para determinar la presencia de la construcción en las células hospedadoras. Una vez se han identificado las células hospedadoras modificadas, entonces pueden usarse según lo planificado, por ejemplo, expandirse en cultivo o introducirse en un organismo hospedador.

Dependiendo de la naturaleza de las células, las células pueden introducirse en un organismo hospedador, por ejemplo, un mamífero, en una amplia diversidad de maneras. Las células pueden introducirse en el sitio del tumor, en aspectos específicos descritos en el presente documento, aunque en aspectos alternativos descritos en el presente documento, las células sintonizan con el cáncer o se modifican para que sintonicen con el cáncer. El número de células que se emplea dependerá de varias circunstancias, el propósito de la introducción, el tiempo de vida de las células, el protocolo a usar, por ejemplo, el número de administraciones, la capacidad de las células de multiplicarse, la estabilidad de la construcción recombinante y similares. Las células pueden aplicarse como una dispersión, inyectándose en general en o cerca del sitio de interés. Las células pueden estar en un medio fisiológicamente aceptable.

La introducción del ADN no necesita provocar integración, en cualquier caso. En algunas situaciones, el mantenimiento transitorio del ADN introducido puede ser suficiente. De esta manera, se podría tener un efecto a corto plazo, donde las células podrían introducirse en el hospedador y después activarse tras un tiempo predeterminado, por ejemplo, después de que las células hayan podido migrar de manera dirigida a un sitio particular.

Las células pueden administrarse según se desee. Dependiendo de la respuesta deseada, la forma de administración, la vida de las células, el número de células presentes, pueden emplearse diversos protocolos. El número de administraciones dependerá de los factores descritos anteriormente al menos en parte.

Debe apreciarse que el sistema está sujeto a muchas variables, tal como la respuesta celular al ligando, la eficacia de expresión y, según lo apropiado, el nivel de expresión, la actividad del producto de expresión, la necesidad particular del paciente, que puede variar con el tiempo y las circunstancias, la tasa de pérdida de la actividad celular como resultado de la pérdida de células o la actividad de expresión de células individuales y similares. Por lo tanto, se espera que para cada paciente individual, incluso si hubiera células universales que pudieran administrarse a la población en su totalidad, cada paciente se controlaría en cuanto a la dosificación apropiada para el individuo, y dichas prácticas de control de un paciente son habituales en la técnica.

VI. Sistemas de expresión basados en ácido nucleico

Un polinucleótido que codifica el CAR GPC3 y opcionalmente un gen suicida puede comprender un vector de expresión

A. Vectores

El término "vector" se usa para referirse a una molécula de ácido nucleico portadora en la que se puede insertar una secuencia de ácido nucleico para su introducción en una célula donde se pueda replicar. Una secuencia de ácido nucleico puede ser "exógena", lo que significa que es foránea a la célula en la que se introduce el vector o que la secuencia es homóloga a una secuencia de la célula, pero en una posición dentro del ácido nucleico de la célula hospedadora en la que normalmente no se encuentra la secuencia. Los vectores incluyen plásmidos, cósmidos, virus (bacteriófago, virus animales y virus vegetales) y cromosomas artificiales (por ejemplo, YAC). Un experto en la materia estaría bien equipado para construir un vector a través de técnicas recombinantes convencionales (véase, por ejemplo, Maniatis *et al.*, 1988 y Ausubel *et al.*, 1994).

La expresión "vector de expresión" se refiere a cualquier tipo de construcción genética que comprenda un ácido nucleico que codifique un ARN que pueda transcribirse. En algunos casos, las moléculas de ARN se traducen luego en una proteína, un polipéptido o un péptido. En otros casos, estas secuencias no se traducen, por ejemplo, en la producción de moléculas de antisentido o ribozimas. Los vectores de expresión pueden contener una diversidad de "secuencias de control", que se refieren a secuencias de ácido nucleico necesarias para la transcripción y posiblemente la traducción de una secuencia codificante unida de forma funcional en una célula hospedadora particular. Además de las secuencias de control que rigen la transcripción y la traducción, los vectores y los vectores de expresión pueden contener secuencias de ácido nucleico que también cumplan otras funciones, y se describen a continuación.

B. Promotores y potenciadores

Un "promotor" es una secuencia de control que es una región de una secuencia de ácido nucleico en la que se controla el inicio y la velocidad de la transcripción. Puede contener elementos genéticos a los que pueden unirse proteínas y moléculas reguladoras, tales como ARN polimerasa y otros factores de transcripción, para iniciar la transcripción específica de una secuencia de ácido nucleico. Las expresiones "situado/a de forma funcional" "unido/a de forma funcional", "bajo control", y "bajo control transcripcional" significa que un promotor está en una ubicación y/u orientación funcional correcta en relación con una secuencia de ácido nucleico para controlar el inicio y/o la expresión transcripcional de esa secuencia.

Un promotor en general comprende una secuencia que funcional situando el sitio de inicio para la síntesis de ARN. El ejemplo mejor conocido de esto es la secuencia TATA, pero en algunos promotores que carece de una secuencia TATA, tal como, por ejemplo, el promotor del gen de la desoxinucleotidil terminal transferasa de mamífero y el promotor de los genes tardíos de SV40, un elemento diferenciado superpuesto al propio sitio de inicio ayuda a fijar el lugar de iniciación. Elementos promotores adicionales regulan la frecuencia de iniciación transcripcional. Típicamente, estos están ubicados en la región 30 110 pb en dirección 5' del sitio de inicio, aunque varios promotores han demostrado contener elementos funcionales en dirección 3' del sitio de inicio también. Para poner una secuencia codificante "bajo el control de" un promotor, se pone el extremo 5' del sitio de iniciación de la transcripción del marco de lectura transcripcional "secuencia abajo" (es decir, 3') del promotor elegido. El promotor "en dirección 5'" estimula la transcripción del ADN y promueve la expresión del ARN codificado.

El espaciado entre los elementos promotores frecuentemente es flexible, de modo que la función del promotor se conserva cuando los elementos se invierten o mueven unos con respecto a otros. En el promotor tk, el espaciado entre los elementos promotores puede aumentarse hasta 50 pb entre sí antes de que la actividad empiece a disminuir. Dependiendo del promotor, parece que elementos individuales pueden funcionar cooperativa o independientemente para activar la transcripción. Un promotor puede usarse o no junto con un "potenciador", que se refiere a una secuencia reguladora de acción *in cis* que participa en la activación transcripcional de una secuencia de ácido nucleico.

Un promotor puede ser uno asociado de forma natural con una secuencia de ácido nucleico, que puede obtenerse aislando las secuencias 5' no codificantes ubicadas en dirección 5' del segmento codificante y/o exón. Dicho promotor puede denominarse "endógeno". Asimismo, un potenciador puede ser uno asociado de forma natural con una secuencia de ácido nucleico, ubicado en dirección 5' o 3' de esa secuencia. Como alternativa, se obtendrán determinadas ventajas colocando el segmento de ácido nucleico codificante bajo el control de un promotor recombinante o heterólogo, que se refiere a un promotor que normalmente no está asociado con una secuencia de ácido nucleico en su entorno natural. Un potenciador recombinante o heterólogo también se refiere a un potenciador no asociado normalmente con una secuencia de ácido nucleico en su ambiente natural. Dichos promotores o potenciadores pueden incluir promotores o potenciadores de otros genes, y promotores o potenciadores aislados de cualquier otro virus, o célula procariota o eucariota, y promotores y potenciadores que no son "de origen natural", es decir, que contienen diferentes elementos de diferentes regiones reguladoras de la transcripción y/o mutaciones que alteran la expresión. Por ejemplo, los promotores que se usan más habitualmente en construcción de ADN

recombinante incluyen los sistemas promotores de beta-lactamasa (penicilinas), lactosa y triptófano (trp). Además de producir secuencias de ácido nucleico de promotores y potenciadores de forma sintética, pueden producirse secuencias usando clonación recombinante y/o tecnología de amplificación de ácido nucleico, incluyendo PCR™, en relación con las composiciones divulgadas en el presente documento (véanse las patentes de Estados Unidos n.º 4.683.202 y 5.928.906). Además, también se contempla la posibilidad de emplear las secuencias de control que dirigen la transcripción y/o expresión de secuencias dentro de orgánulos no nucleares tales como mitocondrias, cloroplastos y similares.

Naturalmente, será importante emplear un promotor y/o potenciador que dirija eficazmente la expresión del segmento de ADN en el orgánulo, tipo celular, tejido, órgano u organismo elegido para la expresión. En general, los expertos en la materia de la biología molecular conocen el uso de promotores, potenciadores y combinaciones de tipos de células para la expresión de proteínas, (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* 1989). El promotor empleado puede ser constitutivo, específico de tejido, inducible y/o útil en las condiciones apropiadas para dirigir la expresión de alto nivel del segmento de ADN introducido, tal como es ventajoso en la producción a gran escala de proteínas y/o péptidos recombinantes. El promotor puede ser heterólogo o endógeno.

Adicionalmente, también podría usarse cualquier combinación de promotor/potenciador para dirigir la expresión. El posible uso de un sistema de expresión citoplásmico de T3, T7 o SP6. Las células eucariotas pueden mantener la transcripción citoplásmica de determinados promotores bacterianos si se proporciona la polimerasa bacteriana apropiada, como parte del complejo de administración o como una construcción de expresión genética adicional.

La identidad de los promotores o elementos específicos de tejido, así como los ensayos para caracterizar su actividad, son muy conocidos por los expertos en la materia.

También se puede requerir una señal de iniciación específica para la traducción eficaz de secuencias codificantes. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG o secuencias adyacentes. Pueden que tengan que proporcionarse señales de control de la traducción exógenas, incluyendo el codón de iniciación ATG. Un experto en la materia sería capaz de determinar esto fácilmente y de proporcionar las señales necesarias.

En determinados aspectos descritos en el presente documento, la expresión del CAR GPC3 se modula tras exposición de una secuencia reguladora correspondiente a uno o más factores. En aspectos específicos descritos en el presente documento, la expresión se modula tras exposición a factores asociados a tumor. Ejemplos ilustrativos de factores asociados a tumor incluyen factores presentes en tejido hipóxico. En algunos aspectos descritos en el presente documento, los factores son citocinas y/o quimiocinas. Por ejemplo, la hipoxia induce la expresión de HIF-1 α , un factor de transcripción que podría inducir la expresión de engager que está bajo el control de un elemento de respuesta a hipoxia (HRE). La hipoxia también podría estabilizar moléculas engager que contienen un dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODDD). Otro ejemplo de una sustancia, que se produce por células tumorales y podría regular la expresión génica de engager, es el ácido láctico. También se puede requerir una señal de iniciación específica para la traducción eficaz de secuencias codificantes. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG o secuencias adyacentes. Pueden que tengan que proporcionarse señales de control de la traducción exógenas, incluyendo el codón de iniciación ATG. Un experto en la materia sería capaz de determinar esto fácilmente y de proporcionar las señales necesarias.

En determinados aspectos descritos en el presente documento, el CAR GPC3 puede expresarse en dos fragmentos que son inactivos sin la adición de una sustancia exógena. Por ejemplo, aunque sin limitación, el ectodominio específico de GPC3 y el dominio transmembranario del CAR y el dominio citoplasmático del CAR podrían ligarse cada uno a un dominio de heterodimerización (Exto-TM-HD; Cyto-HD). La expresión de Exto-TM-HD y Cyto-HD en células podría producir un CAR GPC3 inactivo salvo que se añada una molécula pequeña que ligue Exto-TM-HD y Cyto-HD, lo que permite el control farmacológico de la actividad de CAR GPC3.

En determinados aspectos de la divulgación, el uso de elementos de sitios internos de entrada de ribosomas (IRES, *Internal Ribosome Entry Sites*) se emplea para crear mensajes multigénicos o policistrónicos, y estos pueden usarse en la divulgación.

En determinados aspectos descritos en el presente documento, se usan secuencias 2A para crear mensajes multigénicos, y estos pueden usarse en los aspectos descritos en el presente documento.

Los vectores pueden incluir un sitio de clonación múltiple (MCS, *Multiple Cloning Site*), que es una región de ácido nucleico que contiene múltiples sitios de enzimas de restricción, de los que cualquiera puede usarse junto con la tecnología recombinante convencional para digerir el vector. La "digestión con enzimas de restricción" se refiere a la escisión catalítica de una molécula de ácido nucleico con una enzima que funciona solo en ubicaciones específicas en una molécula de ácido nucleico. Muchas de estas enzimas de restricción están disponibles en el mercado. El uso de dichas enzimas está ampliamente comprendido por los expertos en la materia. Con frecuencia, un vector se linealiza o fragmenta usando una enzima de restricción que corta dentro del MCS para posibilitar que las secuencias exógenas se ligan en el vector. "Ligamiento" se refiere al proceso de formación de enlaces fosfodiéster entre dos fragmentos de ácido nucleico, que pueden ser contiguos entre sí o no. Los expertos en la materia de la tecnología recombinante

conocen bien las técnicas que implican enzimas de restricción y reacciones de ligamiento.

También pueden emplearse sitios de corte y empalme, señales de terminación, orígenes de replicación y marcadores de selección.

5

C. Vectores plasmídicos

En determinados aspectos descritos en el presente documento, se contempla un vector plasmídico para su uso para transformar una célula hospedadora. En general, se usan vectores plasmídicos que contienen replicón y secuencias de control que derivan de especies compatibles con la célula hospedadora en relación con estos hospedadores. El vector normalmente porta un sitio de replicación, así como secuencias marcadoras que pueden proporcionar selección fenotípica en células transformadas. En un ejemplo no limitante, a menudo se transforma *E. coli* usando derivados de pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. coli*. pBR322 contiene genes de resistencia a ampicilina y tetraciclina y, por tanto, proporciona un medio fácil para identificar células transformadas. El plásmido pBR, u otro plásmido microbiano o fago debe contener también, o modificarse para que contenga, por ejemplo, promotores que pueda usar el organismo microbiano para la expresión de sus propias proteínas.

Además, los vectores de fagos que contienen replicón y secuencias de control que son compatibles con el microorganismo hospedador pueden usarse como vectores de transformación en relación con estos hospedadores. Por ejemplo, el fago lambda GEMTM 11 puede utilizarse en la generación de un vector de fago recombinante que puede usarse para transformar células hospedadoras, tal como, por ejemplo, *E. coli* LE392.

Otros vectores plasmídicos útiles incluyen vectores pIN (Inouye *et al.*, 1985); y vectores pGEX, para su uso en la generación de proteínas de fusión solubles de glutatión S transferasa (GST) para posterior purificación y separación o escisión. Otras proteínas de fusión adecuadas son aquellas con beta-galactosidasa, ubiquitina y similares.

Las células hospedadoras bacterianas, por ejemplo, *E. coli*, que comprenden el vector de expresión, se hacen crecer en cualquiera de varios medios adecuados, por ejemplo, LB. La expresión de la proteína recombinante en determinados vectores puede inducirse, como comprenderían los expertos en la materia, poniendo en contacto la célula hospedadora con un agente específico para determinados promotores, por ejemplo, añadiendo IPTG al medio o cambiando la incubación a una temperatura mayor. Después de cultivar las bacterias durante un periodo adicional, en general entre 2 y 24 h, las células se recogen por centrifugación y se lavan para eliminar el medio residual.

D. Vectores víricos

La capacidad de determinados virus de infectar células o entrar en células mediante endocitosis mediada por receptor, y de integrarse en el genoma de células hospedadoras y expresar genes víricos de forma estable y eficaz ha hecho que sean candidatos atractivos para la transferencia de ácidos nucleicos exógenos a células (por ejemplo, células de mamífero). Los componentes de la presente divulgación pueden ser un vector vírico que codifica uno o más CAR de la divulgación. Ejemplos no limitantes de vectores víricos que pueden usarse para administrar un ácido nucleico de la presente divulgación se describen a continuación.

E. Vectores adenovíricos

Un método particular para la administración del ácido nucleico implica el uso de un vector de expresión adenovírico. Aunque se sabe que los vectores adenovíricos tienen una baja capacidad de integración en ADN genómico, este rasgo característico se equilibra por la alta eficacia de transferencia génica producida por estos vectores. Se entiende que "vector de expresión adenovírico" incluye aquellas construcciones que contienen secuencias adenovíricas suficientes para (a) mantener el empaquetamiento de la construcción y (b) para expresar finalmente una construcción específica de tejido o célula en que se ha clonado. El conocimiento de la organización genética o adenovirus, un virus de ADN bicatenario, lineal, de 36 kb, permite la sustitución de trozos grandes de ADN adenovírico con secuencias exógenas de hasta 7 kb (Grunhaus y Horwitz, 1992).

F. Vectores AAV

El ácido nucleico puede introducirse en la célula usando transfección asistida por adenovirus. Se ha informado de eficacias de transfección aumentadas en sistemas celulares usando sistemas acoplados a adenovirus (Kelleher y Vos, 1994; Cotten *et al.*, 1992; Curiel, 1994). El virus adenoasociado (AAV) es un sistema de vector atractivo para su uso en células de la presente divulgación, ya que tiene una frecuencia alta de integración y puede infectar células que no se dividen, haciendo, por tanto, que sea útil para la administración de genes a células de mamífero, por ejemplo, en histocultivo (Muzyczka, 1992) o *in vivo*. El AAV tienen un amplio intervalo de hospedador para la infectividad (Tratschin *et al.*, 1984; Laughlin *et al.*, 1986; Lebkowski *et al.*, 1988; McLaughlin *et al.*, 1988). Se describen detalles que se refieren a la generación y uso de vectores rAAV en las patentes de Estados Unidos n.º 5.139.941 y 4.797.368.

G. Vectores retrovíricos

Los retrovirus son útiles como vectores de administración a causa de su capacidad de integrar su genes en el genoma hospedador, de transferir una gran cantidad de material genético exógeno, de infectar un amplio espectro de especies y tipos celulares y de empaquetarse en líneas celulares especiales (Miller, 1992).

- 5 Para construir un vector retrovítico, se inserta un ácido nucleico (por ejemplo, uno que codifica la secuencia deseada) en el genoma vírico en el lugar de determinadas secuencias víricas para producir un virus que tenga replicación defectuosa. Para producir viriones, se construye una línea celular de empaquetado que contiene los genes gag, pol y env, pero sin la LTR y los componentes de empaquetado (Mann *et al.*, 1983). Cuando un plásmido recombinante que contiene un ADNc, junto con la LTR retrovítica y las secuencias de empaquetado se introduce en una línea celular especial (por ejemplo, por precipitación con fosfato de calcio, por ejemplo), la secuencia de empaquetado permite que el transcrito de ARN del plásmido recombinante se empaquete en partículas víricas, que después se secretan al medio de cultivo (Nicolas y Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann *et al.*, 1983). El medio que contiene los retrovirus recombinantes se recogen entonces, se concentran opcionalmente y se usan para transferencia génica. Los vectores retrovíticos pueden infectar una amplia diversidad de tipos celulares. Sin embargo, la integración y expresión estable requieren la división de las células hospedadoras (Paskind *et al.*, 1975).

- Los lentivirus son retrovirus complejos, que, además de los genes retrovíticos comunes gag, pol y env, contienen otros genes con función reguladora o estructural. Los vectores lentivíricos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Naldini *et al.*, 1996; Zufferey *et al.*, 1997; Blomer *et al.*, 1997; patentes de Estados Unidos n.º 6.013.516 y 5.994.136). Algunos ejemplos de lentivirus incluyen los virus de la inmunodeficiencia humana: VIH-1, VIH-2 y el virus de la inmunodeficiencia del simio: VIS. Se han generado vectores lentivíricos atenuando de forma múltiple los genes de virulencia del VIH, por ejemplo, los genes env, vif, vpr, vpu y nef se eliminan haciendo que el vector sea biológicamente seguro.

- 25 Los vectores lentivíricos recombinantes pueden infectar células que no se dividen y pueden usarse para la transferencia de genes tanto *in vivo* como *ex vivo*, y la expresión de secuencias de ácido nucleico. Por ejemplo, se describe lentivirus recombinante que puede infectar una célula que no se divide, en el que se transfecta una célula hospedadora adecuada con dos o más vectores que portan las funciones de empaquetado, en concreto, gag, pol y env, así como rev y tat en la patente de Estados Unidos n.º 5.994.136. Se puede dirigir al virus recombinante mediante unión de la proteína de la envoltura con un anticuerpo o un ligando particular para que se dirija a un receptor de un tipo de célula particular. Al insertar una secuencia (incluyendo una región reguladora) de interés en el vector vírico, junto con otro gen que codifica el ligando para un receptor en una célula diana específica, por ejemplo, el vector ahora es específico de la diana.

35 H. Otros vectores víricos

- Pueden emplearse otros vectores víricos como construcciones de vacuna en la presente divulgación. Pueden emplearse vectores derivados de virus tales como virus de la variolovacuna (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Coupar *et al.*, 1988), virus sindbis, citomegalovirus y virus del herpes simple. Ofrecen varios rasgos característicos para diversas células de mamífero (Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Coupar *et al.*, 1988; Horwich *et al.*, 1990).

I. Administración usando virus modificados

- 45 Un ácido nucleico a administrar puede alojarse dentro de un virus infeccioso que se ha genomanipulado para que exprese un ligando de unión específico. La partícula vírica, por tanto, se unirá específicamente a los receptores análogos de la célula diana y administrará los contenidos a la célula. Se desarrolló una estrategia novedosa diseñada para permitir la dirección específica de vectores retrovíticos, basándose en la modificación química de un retrovirus por la adición química de residuos de lactosa a la envoltura vírica. Esta modificación puede permitir la infección específica de hepatocitos mediante receptores de sialoglicoproteína.

- Se diseñó otra estrategia para dirigir retrovirus recombinantes en que se usaron anticuerpos biotinilados contra una proteína de la envoltura retrovítica y contra un receptor celular específico. Los anticuerpos se acoplaron mediante los componentes de biotina usando estreptavidina (Roux *et al.*, 1989). Usando anticuerpos contra antígeno del complejo principal de histocompatibilidad de clase I y clase II, demostraron la infección de una diversidad de células humanas que portaban esos antígenos superficiales con un virus ecotrópico *in vitro* (Roux *et al.*, 1989).

J. Administración de vector y transformación celular

- 60 Los métodos adecuados para administración de ácido nucleico para la transfección o transformación de células son conocidos por los expertos en la materia. Dichos métodos incluyen, aunque sin limitación, administración directa de ADN tal como por transfección *ex vivo*, por inyección y similares. Mediante la aplicación de técnicas conocidas en la técnica, las células pueden transformarse de forma estable o transitoria.

65 K. Transformación *ex vivo*

Los métodos para transfectar células eucariotas y tejidos retirados de un organismo en un entorno *ex vivo* son conocidos por los expertos en la materia. Por tanto, se contempla que las células o tejidos pueden retirarse y transfectarse *ex vivo* usando ácidos nucleicos de la presente divulgación. En aspectos particulares, las células o tejidos trasplantados pueden colocarse en un organismo. En determinados aspectos, un ácido nucleico se expresa en las células trasplantadas.

VII. Kits de la divulgación

Cualquiera de las composiciones de CAR GPC3 descritas en el presente documento puede estar comprendida en un kit. En un ejemplo no limitante, una o más células para su uso en tratamiento celular y/o los reactivos para generar una o más células para su uso en tratamiento celular, que portan vectores de expresión recombinantes pueden estar comprendidas en un kit. Pueden incluirse polinucleótidos que codifican el CAR GPC3 o partes del mismo en el kit. Los componentes del kit se proporcionan en un recipiente adecuado.

Algunos componentes de los kits pueden envasarse en medio acuoso o en forma liofilizada. El recipiente de los kits en general incluirá al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, frasco, jeringa u otro recipiente, en el que se puede colocar un componente y, preferentemente, distribuir en alícuotas adecuadamente. Cuando existe más de un componente en el kit, el kit también contendrá en general un segundo, tercer u otro recipiente adicional en los que los componentes adicionales se pueden colocar por separado. Sin embargo, en un vial pueden estar comprendidas diversas combinaciones de componentes. Los kits de la presente divulgación típicamente incluirán también un medio para contener los componentes en estrecho confinamiento para venta comercial. Dichos recipientes pueden incluir recipientes de plástico moldeados por inyección o soplado en los que se conserven los viales deseados.

Cuando los componentes del kit se proporcionan en una y/o más soluciones líquidas, la solución líquida es una solución acuosa, siendo particularmente útil una solución acuosa estéril. En algunos casos, el recipiente puede ser en sí mismo una jeringa, una pipeta y/u otro aparato similar, desde el que puede aplicarse la formulación a una zona infectada del cuerpo, inyectarse en un animal y/o incluso aplicarse a y/o mezclarse con los otros componentes del kit.

Sin embargo, los componentes del kit pueden proporcionarse como uno o más polvos secos. Cuando los reactivos y/o componentes se proporcionan como un polvo seco, el polvo se puede reconstituir mediante la adición de un disolvente adecuado. Se prevé que el disolvente también se pueda proporcionar en otro recipiente. Los kits también pueden comprender un segundo recipiente para que contenga un tampón farmacéuticamente aceptable estéril y/u otro diluyente.

En aspectos particulares de la divulgación, las células que tienen que usarse para tratamiento celular se proporcionan en un kit y, en algunos casos, las células son esencialmente el único componente del kit. El kit puede comprender reactivos y materiales para preparar la célula deseada. En aspectos específicos descritos en el presente documento, los reactivos y materiales incluyen cebadores para amplificar secuencias deseadas, nucleótidos, tampones adecuados o reactivos tamponantes, sal y similares y, en algunos casos, los reactivos incluyen vectores y/o ADN que codifican un CAR como se describe en la presente divulgación y/o elementos reguladores para los mismos.

En aspectos particulares descritos en el presente documento, hay uno o más aparatos en el kit adecuados para extraer una o más muestras de un individuo. El aparato puede ser una jeringa, bisturí y similares.

En algunos casos de la divulgación, el kit, además de los aspectos de tratamiento celular, también incluye un segundo tratamiento contra el cáncer, tal como quimioterapia, hormonoterapia y/o inmunoterapia, por ejemplo. El uno o más kits pueden adaptarse para un cáncer particular para un individuo y comprender los respectivos segundos tratamientos contra el cáncer para el individuo.

VIII. Ejemplos de métodos de tratamiento

En diversos aspectos descritos en el presente documento, las construcciones de CAR dirigidas a GPC3, secuencias de ácido nucleico, vectores, células hospedadoras, que se contemplan en el presente documento y/o composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos se usan para la prevención, tratamiento o mejora de una enfermedad cancerosa, tal como una enfermedad tumoral. En aspectos particulares descritos en el presente documento, la composición farmacéutica de la presente divulgación puede ser particularmente útil en la prevención, mejora y/o tratamiento del cáncer, incluyendo cáncer que expresa GPC3 y que puede ser tumores sólidos o no, por ejemplo. En aspectos específicos descritos en el presente documento, el individuo tiene el síndrome de Simpson-Golabi-Behmel.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" o "tratar" incluye cualquier efecto beneficioso o deseable sobre los síntomas o patología de una enfermedad o afección patológica, y puede incluir incluso reducciones mínimas en uno o más marcadores medibles de la enfermedad o afección que se esté tratando, por ejemplo, cáncer. El tratamiento puede implicar opcionalmente la reducción o mejora de síntomas de la enfermedad o afección, o el retardo de la progresión de la enfermedad o afección. "Tratamiento" no indica necesariamente erradicación o cura completa de la enfermedad o afección, o síntomas asociados de la misma.

Como se usan en el presente documento, "prevenir", y palabras similares como "prevenido", "prevención" etc., indican una estrategia para prevenir, inhibir o reducir la probabilidad de que aparezca o reaparezca, una enfermedad o afección, por ejemplo, cáncer. También se refiere a retardar el inicio o reaparición de una enfermedad o afección o retardar la aparición o reaparición de los síntomas de una enfermedad o afección. Como se usan en el presente documento, "prevención" y palabras similares también incluyen reducir la intensidad, efecto, síntomas y/o carga de una enfermedad o afección antes del inicio o reaparición de la enfermedad o afección.

En aspectos particulares descritos en el presente documento, la presente divulgación contempla, en parte, células que expresan CAR GPC3, construcciones de CAR GPC3, moléculas de ácido nucleico de CAR GPC3 y vectores de CAR GPC3 que pueden administrarse en solitario o en cualquier combinación usando vectores convencionales y/o sistemas de administración génica y, en al menos algunos aspectos, junto con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En determinados aspectos descritos en el presente documento, después de la administración, las moléculas de ácido nucleico o vectores pueden integrarse de forma estable en el genoma del sujeto.

En aspectos específicos descritos en el presente documento, pueden usarse vectores víricos que son específicos para determinadas células o tejidos y persisten en dichas células. Los vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica. Las composiciones preparadas de acuerdo con la divulgación pueden usarse para la prevención o tratamiento o retardo de las enfermedades identificadas anteriormente.

Además, la divulgación se refiere a un método para la prevención, tratamiento o mejora de una enfermedad tumoral, que comprende la etapa de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de células que expresan un CAR dirigido a GPC3, una secuencia de ácido nucleico, un vector, como se contempla en el presente documento y/o producido por un proceso como se contempla en el presente documento.

Las posibles indicaciones para la administración de la una o más composiciones de las células CAR GPC3 ilustrativas son enfermedades cancerosas, incluyendo enfermedades tumorales, incluyendo carcinoma hepatocelular, un hepatoblastoma, un sarcoma embrionario, un tumor rabdoide, un tumor de Wilms, tumor del saco vitelino, coriocarcinoma, un carcinoma escamocelular del pulmón, un liposarcoma, un carcinoma de mama, un carcinoma escamocelular de cabeza y cuello (HNSCC por sus siglas en inglés), o mesotelioma, por ejemplo. Indicaciones ilustrativas para la administración de la una o más composiciones de las células CAR GPC3 son enfermedades cancerosas, incluyendo cualquier neoplasia que exprese GPC3. La administración de la una o más composiciones de la divulgación es útil para todos los estadios y tipos de cáncer, incluyendo para enfermedad mínima residual, cáncer temprano, cáncer avanzado y/o cáncer metastásico y/o cáncer resistente, por ejemplo.

La divulgación abarca además protocolos de coadministración con otros compuestos, por ejemplo, construcciones de anticuerpo biespecífico, toxinas dirigidas u otros compuestos, que actúan mediante inmunocitos. La pauta clínica para la coadministración del uno o más compuestos innovadores puede abarcar la coadministración al mismo tiempo, antes o después de la administración del otro componente. Politerapias particulares incluyen quimioterapia, radiación, cirugía, hormonoterapia u otros tipos de inmunoterapia.

Aspectos descritos en el presente documento se refieren a un kit que comprende una construcción de CAR GPC3 como se define en el presente documento, una secuencia de ácido nucleico como se define en el presente documento, un vector como se define en el presente documento y/o un hospedador como se define en el presente documento. También se contempla que el kit de esta divulgación comprenda una composición farmacéutica como se describe en el presente documento anteriormente, en solitario o en combinación con medicamentos adicionales a administrar a un individuo que necesita tratamiento médico o intervención.

IX. Politerapia

En determinados aspectos de la divulgación, los métodos de la presente divulgación para aspectos clínicos se combinan con otros agentes eficaces en el tratamiento de enfermedad hiperproliferativa, tales como agentes antineoplásicos. Un agente "antineoplásico" puede afectar de forma negativa al cáncer en un sujeto, por ejemplo, destruyendo células cancerosas, induciendo apoptosis en células cancerosas, reduciendo la tasa de crecimiento de células cancerosas, reduciendo la incidencia o número de metástasis, reduciendo el tamaño del tumor, inhibiendo el crecimiento tumoral, reduciendo el aporte de sangre a un tumor o células cancerosas, promoviendo una respuesta inmunitaria contra células cancerosas o un tumor, evitando o inhibiendo la progresión del cáncer, o aumentando la esperanza de vida de un sujeto con cáncer. Más en general, estas otras composiciones se proporcionarían en una cantidad combinada eficaz para destruir o inhibir la proliferación de la célula. Este proceso puede implicar poner en contacto las células cancerosas con la construcción de expresión y el uno o más agentes o múltiples factores al mismo tiempo. Esto se puede conseguir poniendo en contacto la célula con una sola composición o formulación farmacológica que incluya ambos agentes, o poniendo en contacto la célula con dos composiciones o formulaciones distintas, al mismo tiempo, en las que una composición incluye la construcción de expresión y la otra incluye el uno o más segundos agentes.

La resistencia de las células tumorales a quimioterapia y radioterapia representa un problema importante en oncología clínica. Un objetivo de la investigación actual sobre el cáncer es encontrar maneras de mejorar la eficacia de la

quimioterapia y radioterapia combinándola con genoterapia. Por ejemplo, el gen de la timidina cinasa del virus del herpes simple (HSV-tK), cuando se administra a tumores cerebrales mediante un sistema de vector retroviral, indujo satisfactoriamente la susceptibilidad al agente antiviral ganciclovir (Culver, *et al.*, 1992). En el contexto de la presente divulgación, se contempla que el tratamiento celular podría usarse de forma similar con intervención quimioterápica, radioterápica o inmunoterápica, además de otros agentes proapoptóticos o reguladores del ciclo celular.

Como alternativa, el tratamiento de la presente invención puede preceder o seguir al tratamiento con otro agente en intervalos que varían de minutos a semanas. En aspectos descritos en el presente documento donde el otro agente y la presente divulgación se aplican por separado al individuo, habría que asegurarse, en general, de que no pasara un periodo de tiempo significativo entre el momento de cada administración, de modo que el agente y el tratamiento innovador todavía pudieran ejercer un efecto combinado ventajoso sobre la célula. En dichos casos, se contempla que se puede poner en contacto la célula con ambas modalidades en aproximadamente 12-24 horas entre una y otra y, más preferentemente, en aproximadamente 6-12 horas entre una y otra. En algunas situaciones, puede ser deseable prolongar el periodo de tiempo para el tratamiento de manera significativa, sin embargo, cuando transcurren varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7) a varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) entre las administraciones respectivas.

Se pueden emplear diversas combinaciones, siendo la presente divulgación "A" y el segundo agente, tal como radioterapia o quimioterapia, "B":

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

Se espera que los ciclos de tratamiento se repitan según sea necesario. También se contempla que puedan aplicarse diversos tratamientos convencionales, así como intervención quirúrgica, en combinación con el tratamiento celular innovador.

A. Quimioterapia

Los tratamientos contra el cáncer también incluyen una diversidad de politerapias con tratamientos químicos y basados en radiación. Las poliquimioterapias incluyen, por ejemplo, abraxano, altretamina, docetaxel, herceptin, metotrexato, novantrona, zoladex, cisplatino (CDDP), carboplatino, procarbazona, mecloretamina, ciclofosfamida, camptotecina, ifosfamida, melfalán, clorambucilo, busulfano, nitrosurea, dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, bleomicina, plicomicina, mitomicina, etopósido (VP16), tamoxifeno, raloxifeno, agentes de unión a receptor de estrógeno, taxol, gemcitabina, navelbina, inhibidores de la farnesil-proteína transferasa, transplatino, 5-fluorouracilo, vincristina, vinblastina y metotrexato, o cualquier análogo o variante derivada de los anteriores y también combinaciones de los mismos.

En aspectos específicos descritos en el presente documento, la quimioterapia para el individuo se emplea junto con la divulgación, por ejemplo, antes, durante y/o después de la administración de la divulgación.

B. Radioterapia

Otros factores que causan daño en el ADN y se han usado ampliamente incluyen lo que comúnmente se conocen como rayos γ , rayos X y/o la administración dirigida de radioisótopos a las células tumorales. Además, se contemplan otras formas de factores que dañan el ADN, tales como microondas y radiación UV. Es muy probable que todos estos factores logren una amplia serie de daños en el ADN, en los precursores de ADN, en la replicación y reparación de ADN, y en el ensamblaje y mantenimiento de los cromosomas. Los intervalos de dosificación de rayos X varían de dosis diarias de 50 a 200 roentgens durante periodos prolongados de tiempo (3 a 4 semanas), a dosis únicas de 2000 a 6000 roentgens. Los intervalos de dosificación para los radioisótopos varían ampliamente y dependen de la semivida del isótopo, de la fuerza y el tipo de radiación emitida, y de la captación por las células neoplásicas.

Los términos "contactado" y "expuesto", cuando se aplican a una célula, se usan en el presente documento para describir el proceso por el que una construcción terapéutica y un agente quimioterápico o radioterápico se administran a una célula diana o se colocan en yuxtaposición directa con la célula diana. Para conseguir destrucción o estasis celular, ambos agentes se administran a una célula en una cantidad combinada eficaz para destruir la célula o evitar que se divida.

C. Inmunoterapia

Los agentes inmunoterápicos en general se basan en el uso de células y moléculas efectoras inmunitarias para dirigirse a y destruir las células cancerosas. El efector inmunitario puede ser, por ejemplo, un anticuerpo específico para algún marcador de superficie de una célula tumoral. El anticuerpo en solitario puede servir como un efector de tratamiento o puede reclutar otras células que logran realmente la destrucción celular. El anticuerpo también puede

conjugarse con un fármaco o toxina (quimioterápico, radionúclido, cadena A de ricina, toxina colérica, toxina pertúsica, etc.) y servir simplemente con agente de dirección. Como alternativa, el efector puede ser un linfocito que porta una molécula de superficie que interactúa, directa o indirectamente, con una diana de células tumorales. Las diversas células efectoras incluyen linfocitos T citotóxicos y linfocitos NK.

La inmunoterapia distinta del tratamiento innovador descrito en el presente documento, por tanto, podría usarse como parte de una politerapia, junto con el presente tratamiento celular. La estrategia general para politerapia se analiza a continuación. En general, la célula tumoral debe portar algún marcador que pueda utilizarse como diana, es decir, no está presente en la mayoría de otras células. Existen muchos marcadores tumorales y cualquiera de estos puede ser adecuado para su uso como diana en el contexto de la presente divulgación. Los marcadores tumorales comunes incluyen antígeno carcinoembrionario, antígeno prostático específico, antígeno asociado a tumor urinario, antígeno fetal, tirosinasa (p97), gp68, TAG-72, HMFG, antígeno sialil Lewis, MucA, MucB, PLAP, receptor de estrógenos, receptor de laminina, erb B y p155.

D. Genes

En otro aspecto más descrito en el presente documento, el tratamiento secundario es una genoterapia en que se administra un polinucleótido terapéutico antes, después o al mismo tiempo que los aspectos clínicos de la presente divulgación. Se abarca una diversidad de productos de expresión dentro de la divulgación, incluyendo inductores de proliferación celular, inhibidores de proliferación celular, o reguladores de muerte celular programada.

E. Cirugía

Aproximadamente un 60 % de las personas con cáncer se someterán a una cirugía de algún tipo, lo que incluye cirugía preventiva, de diagnóstico o estadificación, curativa y paliativa. La cirugía curativa es un tratamiento contra el cáncer que se puede usar junto con otros tratamientos, tales como el tratamiento de la presente divulgación, quimioterapia, radioterapia, hormonoterapia, genoterapia, inmunoterapia y/o terapias alternativas.

La cirugía curativa incluye la resección en la que todo o parte del tejido canceroso se elimina, extirpa y/o destruye físicamente. Resección tumoral se refiere a la eliminación física de al menos parte de un tumor. Además de la resección tumoral, el tratamiento quirúrgico incluye cirugía láser, criocirugía, electrocirugía y cirugía controlada microscópicamente (cirugía de Mohs). Se contempla además que la presente divulgación pueda usarse junto con la eliminación de cánceres superficiales, de precánceres o de cantidades menores de tejido normal.

Tras la escisión de parte de la totalidad de las células cancerosas, tejido o tumor, se puede formar una cavidad en el cuerpo. El tratamiento puede conseguirse por perfusión, inyección directa o aplicación local a la zona con un tratamiento antineoplásico adicional. Dicho tratamiento puede repetirse, por ejemplo, cada 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, o cada 1, 2, 3, 4 y 5 semanas o cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. Estos tratamientos pueden ser, además, de dosificaciones variables.

F. Otros agentes

Se contempla que se puedan usar otros agentes en combinación con la presente divulgación para mejorar la eficacia terapéutica del tratamiento. Estos agentes adicionales incluyen agentes inmunomoduladores, agentes que afectan la regulación por incremento de receptores de superficie celular y uniones GAP, agentes citostáticos y de diferenciación, inhibidores de la adhesión celular, o agentes que aumentan la sensibilidad de las células hiperproliferativas a inductores apoptóticos. Los agentes inmunomoduladores incluyen el factor de necrosis tumoral; interferón alfa, beta y gamma; IL-2 y otras citocinas; F42K y otros análogos de citocinas; o MIP-1, MIP-1beta, MCP-1, RANTES y otras quimiocinas. Se contempla además que la regulación por incremento de receptores de superficie celular o sus ligandos, tales como Fas/ligando de Fas, DR4 o DR5/TRAIL potenciaría las capacidades inductoras apoptóticas de la presente divulgación mediante el establecimiento de un efecto autocrino o paracrino sobre las células hiperproliferativas. Los aumentos en la señalización intercelular al elevar el número de uniones GAP aumentarían los efectos antihiperproliferativos en la población de células hiperproliferativas vecinas. En otros aspectos descritos en el presente documento, pueden usarse agentes citostáticos o de diferenciación en combinación con la presente divulgación para mejorar la eficacia antihiperproliferativa de los tratamientos. Se contemplan inhibidores de la adhesión celular para mejorar la eficacia de la presente divulgación. Ejemplos de inhibidores de la adhesión celular son los inhibidores de la cinasa de adhesión focal (FAK, por sus siglas en inglés) y la lovastatina. Se contempla además que otros agentes que aumentan la sensibilidad de una célula hiperproliferativa a la apoptosis, tales como el anticuerpo c225, puedan usarse en combinación con la presente divulgación para mejorar la eficacia del tratamiento.

Ejemplo 1

CAR específicos de GPC3

Como se describe en el presente documento, hay CAR específicos de glipicano-3 (CAR GPC3) con distinta combinación de endodominios coestimulantes basados en secuencia publicadas de anticuerpos monoclonales. Se

detectó alta expresión de superficie celular en todos los CAR en linfocitos T. Se generaron linfocitos T específicos de glipicano-3 por transducción retroviral, y reconocen células tumorales que expresan glipicano-3.

Diseño de CAR específicos de glipicano-3: Se generaron CAR con scFv específicos de GPC3 fusionados a cadenas principales de CAR (FIG. 2).

Expresión de superficie celular de CAR GPC3: Se estimularon linfocitos T con OKT3 y anti-CD28 seguido de transducción retroviral. Se midió la expresión de CAR con mAb anti-Fab-AF647 por FACS. Se detectó la expresión de CAR GPC3 en o por encima de un 80 % de las células.

Los linfocitos T CAR GPC3 reconocen y destruyen dianas GPC3^{pos}: Se cargaron líneas celulares GPC3^{pos} (HepG2, HUH7 y Hep3B), así como GPC3^{neg} (A549) con Cr⁵¹ y se incubaron con linfocitos T CAR GPC3 en un ensayo convencional de liberación de Cr⁵¹ de 4 h. Se detectó destrucción eficaz en las 3 dianas GPC3^{pos}, dependiente de la relación de efector a diana, mientras que la diana GPC3^{neg} no se destruyó.

Los linfocitos T CAR GPC3 liberan IFN-γ tras estimulación con dianas GPC3^{pos}: Se cocultivaron linfocitos T CAR GPC3 durante 24 h con líneas celulares GPC3^{pos} (HepG2, HUH7 y Hep3B), así como GPC3^{neg} (A549) a una relación de 1:1. Se midió el nivel de IFN-γ de sobrenadante de histocultivo por Luminex (Millipore) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se detectó alto nivel de producción de IFN-γ para todas las construcciones de CAR GPC3 cuando se estimulaban con dianas GPC3^{pos}, mientras que los linfocitos T no transducidos no producían IFN-γ. No se detectó producción de IFN-γ para linfocitos T CAR GPC3 cuando se estimulaban con diana GPC3^{neg}, excepto para GBBz que inducía liberación espontánea de bajo nivel de IFN-γ.

Por tanto, en el presente documento se proporcionan nuevos CAR específicos de GPC3, y en el presente documento se muestran linfocitos T modificados genéticamente con este CAR que reconoce y destruye células tumorales GPC3 positivas de una manera específica de antígeno. Esta tecnología tiene amplias aplicaciones para la inmunoterapia de enfermedades GPC3 positivas como monoterapia o en combinación con otras modalidades de tratamiento.

Ejemplo 2

CAR de glipicano-3

El glipicano-3 (GPC3) es uno de los seis miembros de mamífero de la familia de proteoglucanos de glipicano. El glipicano-3 contiene cadenas laterales de sulfato de heparano, está anclado a la superficie celular por un glucosil-fosfatidil-inositol (Filmus y Selleck, 2001). El GPC3 no señala directamente a través de la membrana celular, la función principal de GPC3 es estabilizar wnt, aumentando de ese modo su efecto sobre la proliferación celular (Capurro *et al.*, 2014). GPC3 es una diana inmunoterapéutica única que se expresa en varios tumores sólidos, incluyendo la mayoría de carcinomas hepatocelulares (no se expresa en hepatocitos normales después del desarrollo fetal o en hígado cirrótico), hepatoblastomas, sarcomas embrionarios, tumores rabdoide, tumores del saco vitelino, tumores de Wilms, carcinoma escamocelular del pulmón, y liposarcomas (Wang *et al.*, 2006; Yamauchi *et al.*, 2005; Enan *et al.*, 2013; Coston *et al.*, 2008; Baumhoer *et al.*, 2008; Chan *et al.*, 2013; Levy *et al.*, 2012; Tretiakova *et al.*, 2015; Zynger *et al.*, 2008; Zynger *et al.*, 2006; Zynger *et al.*, 2008)). Dada su expresión específica en células cancerosas y su función en la progresión del cáncer, GPC3 es una diana inmunoterapéutica atractiva demostrada recientemente en ensayos clínicos en fase inicial, donde un anticuerpo monoclonal (MAb) dirigido a GPC3 GC33 se toleraba bien e inducía respuestas antitumorales en pacientes con HCC avanzado (Zhu *et al.*, 2013; Ikeda *et al.*, 2014).

Expresión de glipicano-3 en líneas celulares tumorales. HepG2 (HB), HUH7 (HCC) y Hep3B (HCC positiva al virus de la hepatitis B), G401 (tumor rabdoide maligno) y A549 (cáncer pulmonar) se evaluaron para la expresión de GPC3 por análisis FACS usando el anticuerpo YP7 específico de glipicano-3. HepG2 (HB), HUH7 (HCC) y Hep3B (HCC positiva al virus de la hepatitis B), G401 (tumor rabdoide maligno) eran GPC3 positivas mientras que A549 (cáncer pulmonar) era negativa (FIG. 6). Este panel de líneas celulares se usó para caracterizar la función de linfocitos T que expresaban receptores quiméricos de antígeno específicos de GPC3 (CAR GPC3) novedosos.

Estructura y expresión de superficie celular de CAR GPC3. El fragmento variable monocatenario del MAb GC33 específico antiglipicano-3 se clonó en el marco de lectura en vectores retrovirales SFG que contenían casetes de expresión de CAR. Se generaron los cuatro siguientes CAR GPC3: GC33.ζ (Gz), GC33.CD28.ζ (G28z), GC33.4-1BB.ζ (GBBz) y GC33.CD28.4-1BB.ζ (G28BBz) (FIG. 7A). Los linfocitos T se transdujeron con vectores retrovirales que codificaban las construcciones indicadas. Se midió la expresión de superficie celular de los CAR por citometría de flujo usando IgG de cabra antifrmento F(ab)2 de ratón conjugado con AF647. Las 4 construcciones se expresaron de forma estable en la superficie celular de linfocitos T transducidos. (FIG. 7B muestra un diagrama de FACS representativo, FIG. 7C muestra las expresiones de CAR de células de 10 donadores independientes, las barras de error representan desviaciones típicas).

Los linfocitos T CAR GPC3 destruyen líneas celulares GPC3^{pos}. Para ensayar si la expresión transgénica de CAR GPC3 hace que los linfocitos T sean citotóxicos para dianas GPC3^{pos}, se realizó un ensayo convencional de ⁵¹Cr de 4 h. En resumen, se cargaron células diana con ⁵¹Cr, se lavaron y cocultivaron con las células que expresan CAR

GPC3 indicadas en la estufa de incubación convencional de cultivo celular de 37°C. Los sobrenadantes se recogieron después de 4 h, se determinó el porcentaje de lisis celular. Los linfocitos T CAR GPC3 destruyeron células HepG2, HUH7, Hep3B y G401 GPC3^{pos} a todas las relaciones de efector a diana ensayadas. La línea celular A549 GPC3^{neg} no se destruyó por ninguno de los linfocitos T CAR GPC3, lo que confirma la especificidad (FIG. 8).

Los linfocitos T CAR GPC3 secretan citocinas en presencia de células GPC3^{pos}. Habiendo mostrado que los linfocitos T CAR GPC3 destruyen células tumorales GPC3 positivas, a continuación se determinó si también producían citocinas. Los linfocitos T CAR GPC3 se cocultivaron con las líneas celulares indicadas y después de 24 h de cocultivo, se midieron los niveles de citocinas por análisis Luminex. Los linfocitos T que expresaban los cuatro CAR GPC3 produjeron altos niveles de citocinas cuando se acoplaban a líneas celulares GPC3^{pos} (FIG. 10). GBBz produjo menos IL-2 (FIG. 10A-10E) e IL-10 (FIG. 10F-10J). Aunque no se detectó IFN γ cuando los linfocitos T que expresan Gz, G28z o G28BBz se cocultivaban con la línea celular A549 GPC3^{neg}, se detectó producción espontánea de citocinas por linfocitos T que expresan CAR GBBz (FIG. 10K-10O).

Los linfocitos T CAR GPC3 proliferan tras encontrar células GPC3^{pos}. Habiendo mostrado que los linfocitos T CAR GPC3 reconocen (según se considera por la producción de citocinas) y destruyen células tumorales GPC3 positivas, a continuación se evaluó si tenían capacidad de proliferar tras encontrar células tumorales GPC3 positivas. Los linfocitos T CAR GPC3 se cocultivaron con células HUH7 y se expandieron sin citocinas. Los linfocitos T CAR GPC3 se expandieron de una manera dependiente de GPC3 y los linfocitos T CAR G28z, GBBz y G28BBz sobrepasaron los linfocitos T CAR Gz. El número absoluto de linfocitos T CAR GPC3 se muestra en los puntos temporales indicados (FIG. 9A). La dilución en CFSE (como medida de división celular) de linfocitos T CAR GPC3 se muestra 3 días después de estimulación (FIG. 9B). Se muestra la tinción de 7-AAD (como medida de muerte celular) en el día 5 después de estimulación (FIG. 9C).

Los linfocitos T CAR GPC3 se expanden después de transferencia adoptiva *in vivo*. Para el ensayo del potencial proliferativo de linfocitos T CAR GPC3 *in vivo*, a ratones NOD/SCID/IL2 γ ^{nulo} se les inyectó la línea celular HCC HUH7 GPC3^{pos} por vía intraperitoneal seguida 14 días después de la inyección intravenosa (iv) de 1×10^7 linfocitos T CAR GPC3 que también se transdujeron con un vector retroviral que codifica un gen de fusión de luciferasa de luciérnaga GFP (GFP.ffLuc) para permitir la toma de imágenes de bioluminiscencia en serie. Linfocitos T CAR GD2 y los linfocitos T que se transdujeron solamente con GFP.ffLuc sirvieron como controles. Los linfocitos T CAR GPC3 se expandieron durante hasta 6 días después de la inyección. Los linfocitos T que expresan CAR GPC3 con endodominios coestimulantes que contienen 41BB habían demostrado expansión superior en comparación con linfocitos T CAR Gz o G28z (FIG. 11A, B).

Los linfocitos T CAR GPC3 tienen potente actividad antitumoral en los modelos de xenoinjerto de HCC HUH-7 *in vivo*. Para ensayar la actividad antitumoral de los linfocitos T CAR GPC3 *in vivo* y encontrar la construcción con el máximo potencial antitumoral, a ratones NOD/SCID/IL2 γ ^{nulo} se les inyectó la línea celular HCC HUH7 GPC3^{pos}, que se modificó genéticamente con GFP.ffLuc para permitir la toma de imágenes de bioluminiscencia en serie, por vía intraperitoneal seguida 14 días después de la infusión iv de 1×10^7 linfocitos T CAR GPC3 (FIG. 12). Independientemente del endodominio, los linfocitos T CAR GPC3 produjeron un efecto antitumoral robusto que produjo la cura completa de los ratones con gran carga tumoral. La supervivencia de los ratones y la bioluminiscencia del tumor se muestran en FIG. 12A-C respectivamente. Por el contrario, a los ratones a los que se les inyectó placebo, los linfocitos T no transducidos (linfocitos T NT) o los linfocitos T CAR GD2 murieron de progresión tumoral en el día 45 tras la inyección de células tumorales. Como no se observaron diferencias significativas entre diferentes CAR GPC3, se inyectó solamente 1/10 de la dosis de células (1×10^6 linfocitos T CAR) en el estudio de seguimiento. Los linfocitos T que expresan CAR GPC3 con dominios coestimulantes tuvieron mayor actividad en comparación con el CAR GPC3 con solamente un endodominio zeta (FIG. 13A-13C).

Los linfocitos T CAR GPC3 tienen potente actividad antitumoral en el modelo de xenoinjerto de tumor rabdoide maligno G401 *in vivo*. Para ensayar la actividad antitumoral de los linfocitos T CAR GPC3 en un segundo modelo animal ilustrativo *in vivo* y encontrar la construcción con el máximo potencial antitumoral, a ratones NOD/SCID/IL2 γ ^{nulo} se les inyectó la línea celular de tumor rabdoide maligno G401 GPC3^{pos}, que se modificó genéticamente con GFP.ffLuc para permitir la toma de imágenes de bioluminiscencia en serie, por vía intraperitoneal seguida 21 días después de la infusión iv de 2×10^7 linfocitos T CAR GPC3 (FIG. 12). Los linfocitos T CAR GPC3 produjeron un efecto antitumoral robusto que produjo la cura completa de los ratones con gran carga tumoral. La supervivencia de los ratones y la bioluminiscencia del tumor se muestran en FIG. 14A-C respectivamente. Por el contrario, a los ratones a los que se les inyectó placebo, los linfocitos T no transducidos (linfocitos T NT) o los linfocitos T CAR GD2 murieron de progresión tumoral en el día 46 tras la inyección de células tumorales. Los linfocitos T que expresan CAR GPC3 con dominios coestimulantes tuvieron mayor actividad en comparación con el CAR GPC3 con solamente un endodominio zeta (FIG. 14A, 14B).

Sumario de resultados: Se produjeron cuatro CAR GPC3 (Gz, G28z, GBBz y G28BBz) novedosos y se expresaron de forma estable en la superficie celular de linfocitos T por transducción retroviral (FIG. 7). Se demostró en experimentos de cultivo celular que los linfocitos T CAR GPC3 reconocen células cancerosas GPC3 positivas de una manera dependiente de antígeno según se considera por su i) actividad citotóxica (FIG. 8) y ii) capacidad de producir citocinas (FIG. 9) y proliferar (FIG. 10) en presencia de células cancerosas GPC3 positivas. Además, los linfocitos T

CAR GPC3 con endodominios coestimulantes (G28z, GBBz, G28BBz) se expandieron en modelos de xenoinjerto (FIG. 11) y tuvieron robusta actividad antitumoral (FIG. 12, 13, 14). Por tanto, hay un tratamiento celular dirigido a GPC3 con amplia aplicación a neoplasias que expresan GPC3 incluyendo, aunque sin limitación, HCC, hepatoblastoma, sarcoma embrionario, tumor rabdoide, tumor del saco vitelino, tumor de Wilms, carcinoma escamocelular del pulmón y liposarcoma. Aunque en esta ocasión, como un ejemplo, estos CAR se expresan en linfocitos T, los CAR GPC3 novedosos pueden expresarse en una amplia serie de i) inmunocitos incluyendo, aunque sin limitación, linfocitos NK, linfocitos NKT, linfocitos citolíticos inducidos por citocinas (CIK) o linfocitos $\gamma\delta$ T, o ii) células madre que pueden diferenciarse en inmunocitos, por ejemplo.

Ejemplo 3

Uso de linfocitos T citolíticos naturales (NKT) V α 24 invariables como vehículo para CAR específicos de GPC3

Los NKT son un subconjunto evolutivamente conservado de linfocitos innatos que se caracterizan por la expresión de un TCR invariable de cadena α V α 24-J α 18 y reactividad con glucolípidos derivados propios y microbianos presentados por la molécula CD1d monomórfica similar a HLA de clase I. (Porcelli *et al.*, 1993; Lantz *et al.*, 1994; Bendelac *et al.*, 1995). Los NKT pueden dirigir directamente macrófagos de apoyo tumoral y tienen una actividad antitumoral indirecta incluso en neoplasias CD1d negativas (Song *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2012). Además, los NKT pueden activar la citotoxicidad de linfocitos NK, que es un eje bien estudiado de la actividad antitumoral global de linfocitos NKT (Metelitsa *et al.*, 2001; Smyth *et al.*, 2002).

Los NKT se muestran especialmente prometedores para inmunoterapia de carcinoma hepatocelular (HCC) ya que pueden eliminar las células estrelladas hepáticas activadas de apoyo a HCC (aHSC) (Anson *et al.*, 2012) y la presencia de NKT en HCC está asociada con supervivencia mejorada (Guo *et al.*, 2012). La expresión transgénica de CAR GPC3 en NKT, por lo tanto, las posibilitaría con reactividad doble contra células tumorales de HCC y aHSC de apoyo tumoral.

Para demostrar la viabilidad de usar NKT como vehículo de CAR GPC3, se clasificaron positivamente NKT primarios de PBMC de tres donadores sanos con microesferas Milteneyi específicas de V α 24-J α 18, se activaron con la fracción negativa estimulada con alfa-galactosilceramida (aGalCer) de PBMC irradiados autólogos, se transdujeron en el día 3 con vector retrovírico de CAR GPC3 (GC33.CD28.4-1BB.Z) y se expandieron en cultivo con IL-2. En el día 7 después de la transducción, al menos un 98 % de las células en el cultivo eran NKT, como se determina por coexpresión de CD3 y la cadena TCR α invariable (V α 24J α 18). De forma importante, un 60 % - 93 % de los NKT expresaban CAR GPC3 (FIG. 15). Por lo tanto, los NKT humanos primarios pueden transducirse de forma estable con un CAR GPC3 y usarse para inmunoterapia de neoplasias GPC3 positivas.

Referencias

Anson, M. *et al.* Oncogenic beta-catenin triggers an inflammatory response that determines the aggressiveness of hepatocellular carcinoma in mice. *J. Clin. Invest* 122, 586-599 (2012).

Baumhoer D, Tornillo L, Stadlmann S, Roncalli M, Diamantis EK, Terracciano LM. Glypican 3 expression in human nonneoplastic, preneoplastic, and neoplastic tissues: a tissue microarray analysis of 4,387 tissue samples. *Am.J Clin.Pathol* 2008 Jun; 129(6):899-906

Bendelac, A. *et al.* CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. *Science* 268, 863-865 (1995).

Capurro M, Martin T, Shi W, Filmus J. Glypican-3 binds to Frizzled and plays a direct role in the stimulation of canonical Wnt signaling. *J Cell Sci.* 2014 Abr 1;127(Pt 7):1565-75

Chan ES, Pawel BR, Corao DA, Venneti S, Russo P, Santi M, Sullivan LM. Immunohistochemical expression of glypican-3 in pediatric tumors: an analysis of 414 cases. *Pediatr.Dev.Pathol.* 2013 Jul;16(4):272-7

Coston WM, Loera S, Lau SK, Ishizawa S, Jiang Z, Wu CL, Yen Y, Weiss LM, Chu PG. Distinction of hepatocellular carcinoma from benign hepatic mimickers using Glypican-3 and CD34 immunohistochemistry. *Am.J Surg.Pathol* 2008 Mar;32(3):433-44

Enan ET, El-Hawary AK, El-Tantawy DAE-A, Abu-Hashim MM, Helal NM. Diagnostic role of glypican 3 and CD34 for differentiating hepatocellular carcinoma from nonmalignant hepatocellular lesions. *Annals of Diagnostic Pathology* 2013 Dic;17(6):490-3

Filmus J, Selleck SB. Glypicans: proteoglycans with a surprise. *J.Clin. Invest* 2001 Ago;108(4):497-501. PM-CID:PMC209407

Filmus J, Capurro M. Glypican-3: a marker and a therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *FEBS J.* 2013 May;280(10):2471-6

Guo,C.L. *et al.* Associations between infiltrating lymphocyte subsets and hepatocellular carcinoma. Asian Pac. J. Cancer Prev. 13, 5909-5913 (2012).

Ikeda M, Ohkawa S, Okusaka T, Mitsunaga S, Kobayashi S, Morizane C, Suzuki I, Yamamoto S, Furuse J. Japanese phase I study of GC33, a humanized antibody against glypican-3 for advanced hepatocellular carcinoma. Cancer Sci. 2014 Apr;105(4):455-62

Lantz, O. y Bendelac, A. An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans. J. Exp. Med. 180, 1097-1106 (1994).

Levy M, Trivedi A, Zhang J, Miles L, Mattis AN, Kim GE, Lassman C, Anders RA, Misdraji J, Yerian LM, *et al.* Expression of glypican-3 in undifferentiated embryonal sarcoma and mesenchymal hamartoma of the liver. Hum.Pathol. 2012 May;43(5):695-701. PMCID:PMC3568522

Liu, D. *et al.* IL-15 protects NKT cells from inhibition by tumor-associated macrophages and enhances antimetastatic activity. J. Clin. Invest 122, 2221-2233 (2012).

Metelitsa, L.S. *et al.* Human NKT cells mediate antitumor cytotoxicity directly by recognizing target cell CD1d with bound ligand or indirectly by producing IL-2 to activate NK cells. J. Immunol. 167, 3114-3122 (2001).

Porcelli, S., Yockey, C.E., Brenner, M.B., y Balk, S.P. Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4-8- alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain. J. Exp. Med. 178, 1-16 (1993).

Smyth, M.J. *et al.* Sequential production of interferon-gamma by NK1.1(+) T cells and natural killer cells is essential for the antimetastatic effect of alpha-galactosylceramide. Blood 99, 1259-1266 (2002).

Song, L. *et al.* Valpha24-invariant NKT cells mediate antitumor activity via killing of tumor-associated macrophages. J. Clin. Invest 119, 1524-1536 (2009).

Tretiakova M, Zynger DL, Luan C, Andeen NK, Finn LS, Kocherginsky M, Teh BT, Yang XJ. Glypican 3 overexpression in primary and metastatic Wilms tumors. Virchows Arch. 2015 Ene;466(1):67-76

Wang XY, Degos F, Dubois S, Tessitore S, Allegretta M, Guttman RD, Jothy S, Belghiti J, Bedossa P, Paradis Vr. Glypican-3 expression in hepatocellular tumors: diagnostic value for preneoplastic lesions and hepatocellular carcinomas. Human Pathology 2006 Nov;37(11): 1435-41

Yamauchi N, Watanabe A, Hishinuma M, Ohashi Ki, Midorikawa Y, Morishita Y, Niki T, Shibahara J, Mori M, Makuuchi M, *et al.* The glypican 3 oncofetal protein is a promising diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. Mod Pathol 2005 May 13; 18(12): 1591-8

Zynger DL, Gupta A, Luan C, Chou PM, Yang GY, Yang XJ. Expression of glypican 3 in hepatoblastoma: an immunohistochemical study of 65 cases. Hum.Pathol. 2008 Feb;39(2):224-30

Zynger DL, Dimov ND, Luan C, Teh BT, Yang XJ. Glypican 3: a novel marker in testicular germ cell tumors. Am.J.Surg.Pathol. 2006 Dic;30(12): 1570-5

Zynger DL, Everton MJ, Dimov ND, Chou PM, Yang XJ. Expression of glypican 3 in ovarian and extragonadal germ cell tumors. Am.J Clin.Pathol 2008 Ago;130(2):224-30

Zhu AX, Gold PJ, El-Khoueiry AB, Abrams TA, Morikawa H, Ohishi N, Ohtomo T, Philip PA. First-in-man phase I study of GC33, a novel recombinant humanized antibody against glypican-3, in patients with advanced hepatocellular carcinoma. Clin. Cancer Res. 2013 Feb 15;19(4):920-8

Listado de secuencias

<110> Heczey, Andras Attila
Gottschalk, Stephen M.G.
Metelitsa, Leonid S.
Dotti, Gianpietro

<120> Receptores quiméricos de antígeno de glipicano-3

<130> BAYM.P0150WO-11509126

<140> desconocido

<141> 25/09/2015

<150> 62/055.979

<151> 26/09/2014

<160> 33

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 261

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Met Asp Trp Ile Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Gly Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

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

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

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu
50 55 60

Lys Trp Ile Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser
65 70 75 80

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

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

Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu
145 150 155 160

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

Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln
180 185 190

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg
195 200 205

Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
210 215 220

Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr
225 230 235 240

Phe Cys Ser Gln Asn Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Ser Gly Thr
245 250 255

Lys Leu Glu Ile Lys
260

<210> 2
<211> 783
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 2

Ala Thr Gly Gly Ala Thr Thr Gly Gly Ala Thr Thr Thr Gly Gly Cys
1 5 10 15

Gly Cys Ala Thr Thr Cys Thr Gly Thr Thr Thr Cys Thr Gly Gly Thr
20 25 30

Gly Gly Gly Ala Gly Cys Cys Gly Cys Ala Ala Cys Cys Gly Gly Ala
35 40 45

Gly Cys Ala Cys Ala Thr Ala Gly Thr Cys Ala Gly Gly Thr Cys Cys
50 55 60

Ala Gly Cys Thr Gly Cys Ala Gly Cys Ala Gly Thr Cys Ala Gly Gly
65 70 75 80

Ala Gly Cys Cys Gly Ala Ala Cys Thr Gly Gly Thr Gly Cys Gly Gly
85 90 95

5

10

Cys Cys Cys Gly Gly Cys Gly Cys Ala Ala Gly Thr Gly Thr Cys Ala
 100 105 110
 Ala Ala Cys Thr Gly Thr Cys Ala Thr Gly Cys Ala Ala Gly Gly Cys
 115 120 125
 Cys Ala Gly Cys Gly Gly Gly Thr Ala Thr Ala Cys Cys Thr Thr Cys
 130 135 140
 Ala Cys Ala Gly Ala Cys Thr Ala Cys Gly Ala Gly Ala Thr Gly Cys
 145 150 155 160
 Ala Cys Thr Gly Gly Gly Thr Gly Ala Ala Ala Cys Ala Gly Ala Cys
 165 170 175
 Cys Cys Cys Thr Gly Thr Gly Cys Ala Cys Gly Gly Cys Cys Thr Gly
 180 185 190
 Ala Ala Gly Thr Gly Gly Ala Thr Cys Gly Gly Cys Gly Cys Thr Cys
 195 200 205
 Thr Gly Gly Ala Cys Cys Cys Ala Ala Ala Ala Ala Cys Cys Gly Gly
 210 215 220
 Gly Gly Ala Thr Ala Cys Ala Gly Cys Ala Thr Ala Thr Thr Cys Cys
 225 230 235 240
 Cys Ala Gly Ala Ala Gly Thr Thr Thr Ala Ala Ala Gly Gly Ala Ala
 245 250 255
 Ala Gly Gly Cys Cys Ala Cys Thr Cys Thr Gly Ala Cys Cys Gly Cys
 260 265 270
 Thr Gly Ala Cys Ala Ala Gly Ala Gly Cys Thr Cys Cys Thr Cys Thr
 275 280 285
 Ala Cys Thr Gly Cys Cys Thr Ala Cys Ala Thr Gly Gly Ala Gly Cys
 290 295 300
 Thr Gly Ala Gly Gly Ala Gly Cys Cys Thr Gly Ala Cys Ala Thr Cys
 305 310 315 320
 Cys Gly Ala Ala Gly Ala Thr Ala Gly Cys Gly Cys Cys Gly Thr Gly
 325 330 335
 Thr Ala Cys Thr Ala Thr Thr Gly Cys Ala Cys Cys Cys Gly Cys Thr
 340 345 350

Thr	Cys	Thr	Ala	Cys	Thr	Cys	Cys	Thr	Ala	Thr	Ala	Cys	Ala	Thr	Ala	
		355					360					365				
Cys	Thr	Gly	Gly	Gly	Gly	Cys	Cys	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Cys	Thr	
	370					375					380					
Cys	Thr	Gly	Gly	Thr	Gly	Ala	Cys	Cys	Gly	Thr	Cys	Thr	Cys	Thr	Gly	
385					390					395					400	
Cys	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Cys	Thr	Cys	
				405					410					415		
Thr	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Ala	Gly	Thr	
			420					425					430			
Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Ala	Gly	Cys	Gly	
		435					440					445				
Ala	Cys	Gly	Thr	Gly	Gly	Thr	Cys	Ala	Thr	Gly	Ala	Cys	Ala	Cys	Ala	
	450					455					460					
Gly	Ala	Cys	Thr	Cys	Cys	Ala	Cys	Thr	Gly	Thr	Cys	Cys	Cys	Thr	Gly	
465					470					475					480	
Cys	Cys	Cys	Gly	Thr	Gly	Ala	Gly	Cys	Cys	Thr	Gly	Gly	Gly	Cys	Gly	
				485					490					495		
Ala	Thr	Cys	Ala	Gly	Gly	Cys	Thr	Ala	Gly	Cys	Ala	Thr	Thr	Thr	Cys	
			500					505					510			
Cys	Thr	Gly	Thr	Cys	Gly	Ala	Ala	Gly	Thr	Thr	Cys	Ala	Cys	Ala	Gly	
		515					520					525				
Ala	Gly	Thr	Cys	Thr	Gly	Gly	Thr	Gly	Cys	Ala	Cys	Thr	Cys	Ala	Ala	
	530					535					540					
Ala	Cys	Gly	Gly	Ala	Ala	Ala	Thr	Ala	Cys	Cys	Thr	Ala	Thr	Cys	Thr	
545					550					555					560	
Gly	Cys	Ala	Thr	Thr	Gly	Gly	Thr	Ala	Cys	Cys	Thr	Gly	Cys	Ala	Gly	
				565				570						575		
Ala	Ala	Gly	Cys	Cys	Ala	Gly	Gly	Cys	Cys	Ala	Gly	Thr	Cys	Thr	Cys	
			580					585					590			
Cys	Cys	Ala	Ala	Ala	Cys	Thr	Gly	Cys	Thr	Gly	Ala	Thr	Cys	Thr	Ala	

ES 2 844 700 T3

595	600	605
Thr Ala Ala Gly Gly Thr Gly Ala Gly Cys Ala Ala Cys Cys Gly Gly		
610	615	620
Thr Thr Cys Thr Cys Cys Gly Gly Gly Gly Thr Cys Cys Cys Thr Gly		
625	630	635
Ala Cys Ala Gly Ala Thr Thr Thr Thr Cys Thr Gly Gly Ala Ala Gly		
645	650	655
Thr Gly Gly Cys Thr Cys Ala Gly Gly Gly Ala Cys Ala Gly Ala Thr		
660	665	670
Thr Thr Cys Ala Cys Thr Cys Thr Gly Ala Ala Ala Ala Thr Thr Ala		
675	680	685
Gly Cys Ala Gly Ala Gly Thr Gly Gly Ala Gly Gly Cys Cys Gly Ala		
690	695	700
Ala Gly Ala Thr Cys Thr Gly Gly Gly Cys Gly Thr Cys Thr Ala Cys		
705	710	715
Thr Thr Thr Thr Gly Thr Ala Gly Cys Cys Ala Gly Ala Ala Thr Ala		
725	730	735
Cys Cys Cys Ala Cys Gly Thr Cys Cys Cys Ala Cys Cys Ala Ala Cys		
740	745	750
Ala Thr Thr Cys Gly Gly Ala Ala Gly Cys Gly Gly Cys Ala Cys Thr		
755	760	765
Ala Ala Ala Cys Thr Gly Gly Ala Ala Ala Thr Cys Ala Ala Gly		
770	775	780

<210> 3
 <211> 415
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 3

Met Asp Trp Ile Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Gly Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg
20 25 30
Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

ES 2 844 700 T3

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

ES 2 844 700 T3

Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Arg
290 295 300

Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln
305 310 315 320

Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp
325 330 335

Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro
340 345 350

Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp
355 360 365

Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg
370 375 380

Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr
385 390 395 400

Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
405 410 415

<210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 4

5

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

10

<210> 5
<211> 24
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 5

15

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

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile
20

20

<210> 6
<211> 1254
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

25

ES 2 844 700 T3

<400> 6

atggattgga tttggcgcat tctgtttctg gtgggagccg caaccggagc acatagtcag	60
gtccagctgc agcagtcagg agccgaactg gtgcggccccg gcgcaagtgt caaactgtca	120
tgcaaggcca gcgggtatac cttcacagac tacgagatgc actgggtgaa acagaccctt	180
gtgcacggcc tgaagtggat cggcgtctctg gacccaaaaa ccggggatac agcatattcc	240
cagaagttta aaggaaaggc cactctgacc gctgacaaga gtcctctac tgcctacatg	300
gagctgagga gcctgacatc cgaagatagc gccgtgtact attgcacccg cttctactcc	360
tatacatact ggggccaggg gactctggtg accgtctctg caggaggagg aggctctgga	420
ggaggaggga gtggaggcgg gggaagcgac gtgggtcatga cacagactcc actgtccctg	480
cccgtagacc tgggcgatca ggctagcatt tcctgtcgaa gtccacagag tctggtgcac	540
tcaaacggaa atacctatct gcattggtac ctgcagaagc caggccagtc tcccaaactg	600
ctgatctata aggtgagcaa ccggttctcc ggggtccctg acagattttc tggaaagggc	660
tcagggacag atttcaactc gaaaattagc agagtggagg ccgaagatct gggcgtctac	720
ttttgtagcc agaataccca cgtcccacca acattcgaa gcggcactaa actggaaatc	780
aaggagccca aatcttgtga caaaactcac acatgcccac cgtgcccgga tccgaaagat	840
cccaaatttt ggggtgctggt ggtggttggg ggagtcctgg cttgctatag cttgctagta	900
acagtggcct ttattattag agtgaagtcc agcaggagcg cagacgcccc cgcgtaccag	960
cagggccaga accagctcta taacgagctc aatctaggac gaagagagga gtacgatggt	1020
ttggacaaga gacgtggccg ggaccctgag atggggggaa agccgagaag gaagaacctt	1080
caggaaggcc tgtacaatga actgcagaaa gataagatgg cggaggccta cagtgagatt	1140
gggatgaaag gcgagcgccg gaggggcaag gggcacgatg gcctttacca gggctctcagt	1200
acagccacca aggacaccta cgacgccctt cacatgcagg ccctgcccc tcgc	1254

5 <210> 7
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 7
 gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccgatcc gaaa 54

15 <210> 8
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 8
 gatcccaaa 9

25 <210> 9
 <211> 72
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 844 700 T3

<400> 9

```

ttttgggtgc tgggtgggtggg tgggtggagtc ctggcttgct atagcttgct agtaacagtg      60
gcctttatta tt                                                                72

```

5 <210> 10
 <211> 459
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 10

```

Met Asp Trp Ile Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Gly Ala Ala Thr Gly
 1           5           10           15

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

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

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu
 50           55           60

Lys Trp Ile Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser
65           70           75           80

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

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

Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
          115          120          125

Leu Val Thr Val Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130           135           140

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu
145           150           155           160

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

Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln
180           185           190

```

Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg		
		195					200					205					
Phe	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp		
	210					215					220						
Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr		
225					230					235					240		
Phe	Cys	Ser	Gln	Asn	Thr	His	Val	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr		
				245					250					255			
Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys		
			260					265					270				
Pro	Pro	Cys	Pro	Asp	Pro	Lys	Phe	Trp	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly		
		275					280						285				
Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe		
	290					295					300						
Trp	Val	Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	Leu	Leu	His	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn		
305					310					315					320		
Met	Thr	Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Pro	Thr	Arg	Lys	His	Tyr	Gln	Pro	Tyr		
				325					330					335			
Ala	Pro	Pro	Arg	Asp	Phe	Ala	Ala	Tyr	Arg	Ser	Arg	Val	Lys	Phe	Ser		
			340					345					350				
Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr		
		355					360					365					
Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys		
	370					375					380						
Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn		
385					390					395					400		
Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu		
				405					410					415			
Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly		
			420					425					430				
His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr		

ES 2 844 700 T3

435

440

445

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
450 455

<210> 11
<211> 68
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 11

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

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser
20 25 30

Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly
35 40 45

Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala
50 55 60

Ala Tyr Arg Ser
65

<210> 12
<211> 1386
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 12

ES 2 844 700 T3

atggattgga tttggcgcat tctgtttctg gtgggagccg caaccggagc acatagtcag	60
gtccagctgc agcagtcagg agccgaactg gtgcggcccg gcgcaagtgt caaactgtca	120
tgcaaggcca gcgggtatac cttcacagac tacgagatgc actgggtgaa acagaccct	180
gtgcacggcc tgaagtggat cggcgctctg gacccaaaaa ccggggatac agcatattcc	240
cagaagttta aaggaaaggc cactctgacc gctgacaaga gtcctctac tgcctacatg	300
gagctgagga gcctgacatc cgaagatagc gccgtgtact attgcacccg cttctactcc	360
tatacatact ggggccaggg gactctggtg accgtctctg caggaggagg aggctctgga	420
ggaggaggga gtggaggcgg gggaagcgac gtggtcatga cacagactcc actgtccctg	480
cccgtgagcc tgggcgatca ggctagcatt tcctgtcgaa gttcacagag tctggtgcac	540
tcaaacggaa atacctatct gcattggtac ctgcagaagc caggccagtc tcccaaactg	600
ctgatctata aggtgagcaa ccggttctcc ggggtccctg acagattttc tggaagtggc	660
tcagggacag atttcactct gaaaattagc agagtggagg ccgaagatct gggcgtctac	720
ttttgtagcc agaataccca cgtcccacca acattcggaa gcggcactaa actggaaatc	780
aaggagccca aatcttgtga caaaactcac acatgccac cgtgcccgga tccgaaagat	840
cccaaatttt ggggtgctggt ggtggttggg ggagtcctgg cttgctatag cttgctagta	900
acagtggcct ttattatttt ctgggtgagg agtaagagga gcaggctcct gcacagtac	960
tacatgaaca tgactccccg ccgccccggg cccaccgca agcattacca gccctatgcc	1020
ccaccacgag acttcgcagc ctatcgctcc agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc	1080
cccgcgtacc agcagggccga gaaccagctc tataacgagc tcaatctagg acgaagagag	1140
gagtacgatg ttttgacaa gagacgtggc cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga	1200
aggaagaacc ctgaggaagg cctgtacaat gaactgcaga aagataagat gggggagggc	1260
tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc cggaggggca aggggcacga tggcctttac	1320
cagggtctca gtacagccac caaggacacc tacgacgcc ttcacatgca ggcctgccc	1380
cctcgc	1386

<210> 13
 <211> 204
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 13

ttttgggtgc tgggtggtggt tgggtgagtc ctggcttgct atagcttgct agtaacagtg	60
gcctttatta ttttctgggt gaggagtaag aggagcaggc tcctgcacag tgactacatg	120
aacatgactc cccgccgccc cgggccacc cgcaagcatt accagcccta tgccccacca	180
cgcgacttcg cagcctatcg ctcc	204

<210> 14
 <211> 457

ES 2 844 700 T3

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 14

5

Met Asp Trp Ile Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Gly Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

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

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

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu
50 55 60

ES 2 844 700 T3

Lys	Trp	Ile	Gly	Ala	Leu	Asp	Pro	Lys	Thr	Gly	Asp	Thr	Ala	Tyr	Ser	65	70	75	80
Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	85	90	95	
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	100	105	110	
Tyr	Tyr	Cys	Thr	Arg	Phe	Tyr	Ser	Tyr	Thr	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	115	120	125	
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	130	135	140	
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	145	150	155	160
Pro	Val	Ser	Leu	Gly	Asp	Gln	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	165	170	175	
Ser	Leu	Val	His	Ser	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	180	185	190	
Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	195	200	205	
Phe	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	210	215	220	
Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	225	230	235	240
Phe	Cys	Ser	Gln	Asn	Thr	His	Val	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	245	250	255	
Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	260	265	270	
Pro	Pro	Cys	Pro	Asp	Pro	Lys	Phe	Trp	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	275	280	285	
Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Lys	290	295	300	
Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	305	310	315	320

ES 2 844 700 T3

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

Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser
340 345 350

Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu
355 360 365

Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg
370 375 380

Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln
385 390 395 400

Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr
405 410 415

Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp
420 425 430

Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala
435 440 445

Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
450 455

<210> 15
<211> 42
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 15

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> 16
<211> 1380
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 16

ES 2 844 700 T3

atggattgga tttggcgcat tctgtttctg gtgggagccg caaccggagc acatagtcag 60
gtccagctgc agcagtcagg agccgaactg gtgcggcccg gcgcaagtgt caaactgtca 120
tgcaaggcca gcgggtatac cttcacagac tacgagatgc actgggtgaa acagaccctt 180
gtgcacggcc tgaagtggat cggcgctctg gacccaaaaa ccgggggatac agcatattcc 240
cagaagttta aaggaaaggc cactctgacc gctgacaaga gctcctctac tgcctacatg 300
gagctgagga gcctgacatc cgaagatagc gccgtgtact attgcacccg cttctactcc 360
tatacatact gggggccaggg gactctgggtg accgtctctg caggaggagg aggctctgga 420
ggaggaggga gtggaggcgg gggaagcgac gtgggtcatga cacagactcc actgtccctg 480
cccgtgagcc tgggcgatca ggctagcatt tcctgtcgaa gttcacagag tctggtgcac 540
tcaaacggaa atacctatct gcattggtac ctgcagaagc caggccagtc tcccaaactg 600
ctgatctata aggtgagcaa ccggttctcc ggggtccctg acagattttc tggaagtggc 660
tcagggacag atttcaactc gaaaattagc agagtggagg ccgaagatct gggcgtctac 720
ttttgtagcc agaataccca cgtcccacca acattcggaa gcggcactaa actggaaatc 780
aaggagccca aatcttgtga caaaactcac acatgcccac cgtgcccgga tccgaaagat 840
cccaaatttt ggggtgctggt ggtgggttggg ggagtcctgg cttgctatag cttgctagta 900
acagtggcct ttattattaa acggggcaga aagaaactcc tgtatatatt caaacaacca 960
tttatgagac cagtacaaac tactcaagag gaagatggct gtagctgccg atttccagaa 1020
gaagaagaag gaggatgtga actgagagtg aagttcagca ggagcgcaga cggcccccgcg 1080
taccagcagg gccagaacca gctctataac gagctcaatc taggacgaag agaggagtac 1140
gatgttttgg acaagagacg tggccgggac cctgagatgg ggggaaagcc gagaaggaag 1200
aaccctcagg aaggcctgta caatgaactg cagaaagata agatggcgga ggcctacagt 1260
gagattggga tgaaaggcga gcgccggagg ggcaaggggc acgatggcct ttaccagggt 1320
ctcagtacag ccaccaagga cacctacgac gcccttcaca tgcaggccct gccccctcgc 1380

<210> 17
<211> 126
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 17

aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacaac catttatgag accagtacaa 60
actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt 120
gaactg 126

<210> 18
<211> 501
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 18

```

Met Asp Trp Ile Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Gly Ala Ala Thr Gly
1      5      10      15

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

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

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu
50      55      60

Lys Trp Ile Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser
65      70      75      80

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

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

Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
      115      120      125

Leu Val Thr Val Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130      135      140

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu
145      150      155      160

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

Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln
      180      185      190

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg
      195      200      205

Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
210      215      220

Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr
225      230      235      240

```

Phe	Cys	Ser	Gln	Asn	Thr	His	Val	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr		
				245					250					255			
Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys		
			260					265					270				
Pro	Pro	Cys	Pro	Asp	Pro	Lys	Phe	Trp	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly		
		275					280					285					
Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe		
	290					295					300						
Trp	Val	Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	Leu	Leu	His	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn		
305					310					315					320		
Met	Thr	Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Pro	Thr	Arg	Lys	His	Tyr	Gln	Pro	Tyr		
				325					330					335			
Ala	Pro	Pro	Arg	Asp	Phe	Ala	Ala	Tyr	Arg	Ser	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys		
			340					345					350				
Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr		
	355						360					365					
Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu		
	370					375					380						
Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro		
385					390					395					400		
Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly		
				405				410						415			
Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro		
			420					425					430				
Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr		
		435					440					445					
Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly		
	450					455					460						
Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln		
465					470					475					480		
Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln		
				485				490						495			

Ala Leu Pro Pro Arg
500

5
<210> 19
<211> 1512
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 19

atggattgga	tttggcgc	cat	tctgtttctg	gtgggagccg	caaccggagc	acatagtcag	60
gtccagctgc	agcagtcagg	agccgaactg	gtgcggcccc	gcgcaagtgt	caaactgtca		120
tgcaaggcca	gcgggtatac	cttcacagac	tacgagatgc	actgggtgaa	acagaccct		180
gtgcacggcc	tgaagtggat	cggcgtctg	gacccaaaaa	ccggggatac	agcatattcc		240
cagaagttta	aaggaaaggc	cactctgacc	gctgacaaga	gctcctctac	tgcctacatg		300
gagctgagga	gcctgacatc	cgaagatagc	gccgtgtact	attgcacccg	cttctactcc		360
tatacatact	ggggccaggg	gactctggtg	accgtctctg	caggaggagg	aggctctgga		420
ggaggaggga	gtggaggcgg	gggaagcgac	gtggtcatga	cacagactcc	actgtccctg		480
cccgtgagcc	tgggcgatca	ggctagcatt	tcctgtcgaa	gttcacagag	tctggtgcac		540
tcaaacggaa	atacctatct	gcattggtac	ctgcagaagc	caggccagtc	tcccaaactg		600
ctgatctata	aggtgagcaa	ccggttctcc	ggggtccttg	acagattttc	tggaagtggc		660
tcagggacag	atttactct	gaaaattagc	agagtggagg	ccgaagatct	gggcgtctac		720
ttttgtagcc	agaataccca	cgtcccacca	acattcgga	gcggcactaa	actggaaatc		780
aaggagccca	aatcttgtga	caaaactcac	acatgccac	cgtgcccgga	tccgaaagat		840
cccaaatttt	gggtgctgg	ggtggttgg	ggagtcctgg	cttgctatag	cttgctagta		900
acagtggcct	ttattatttt	ctgggtgagg	agtaagagga	gcaggctcct	gcacagtgc		960
tacatgaaca	tgactccccg	ccgccccggg	cccacccgca	agcattacca	gccctatgcc		1020
ccaccacgcg	acttcgcagc	ctatcgctcc	aaacggggca	gaaagaaact	cctgtatata		1080
ttcaaacaac	catttatgag	accagtacaa	actactcaag	aggaagatgg	ctgtagctgc		1140
cgattttccag	aagaagaaga	aggaggatgt	gaactgagag	tgaagttcag	caggagcgca		1200
gacgcccccg	cgtaccagca	ggcccagaac	cagctctata	acgagctcaa	tctaggacga		1260
agagaggagt	acgatgtttt	ggacaagaga	cgtggccggg	accctgagat	ggggggaaag		1320
ccgagaagga	agaaccctca	ggaaggcctg	tacaatgaac	tgcagaaaga	taagatggcg		1380
gaggcctaca	gtgagattgg	gatgaaaggc	gagcgccgga	ggggcaaggg	gcacgatggc		1440
ctttaccagg	gtctcagtac	agccaccaag	gacacctacg	acgcccttca	catgcaggcc		1500
ctgccccctc	gc						1512

10

<210> 20

ES 2 844 700 T3

<211> 344
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 20

```
caggtccagc tgcagcagtc aggagccgaa ctggtgcggc cggcgcaag tgtcaaactg      60
tcatgcaagg ccagcgggta taccttcaca gactacgaga tgcactgggt gaaacagacc      120
cctgtgcacg gcctgaagtg gatcggcgct ctggacccaa aaaccgggga tacagcatat      180
tcccagaagt ttaaaggaaa ggccactctg accgctgaca agagctcctc tactgcctac      240
atggagctga ggagcctgac atccgaagat agcgccgtgt actattgcac ccgcttctac      300
tcctatacat actggggcca ggggactctg gtgaccgtct ctgc                          344
```

10 <210> 21
 <211> 335
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 21

```
gacgtggtca tgacacagac tccactgtcc ctgcccgtga gcctgggcga tcaggctagc      60
atttcctgtc gaagttcaca gagtctggtg cactcaaacg gaaataccta tctgcattgg      120
tacctgcaga agccaggcca gtctccaaa ctgctgatct ataaggtgag caaccggttc      180
tccgggggtcc ctgacagatt ttctggaagt ggctcaggga cagatttcac tctgaaaatt      240
agcagagtgg aggccgaaga tctgggcgtc tacttttgta gccagaatac ccacgtccca      300
ccaacattcg gaagcggcac taaactggaa atcaa                          335
```

20 <210> 22
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 22

ES 2 844 700 T3

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

<210> 23
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 23

5

ES 2 844 700 T3

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

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

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe 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 Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Asn
85 90 95

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

<210> 24
<211> 242
5 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 24

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

10

ES 2 844 700 T3

[illegible]

<210> 25
<211> 726
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

ES 2 844 700 T3

<400> 25

```

cagggtccagc tgcagcagtc aggagccgaa ctggtgcggc ccggcgcaag tgtcaaactg      60
tcatgcaagg ccagcgggta taccttcaca gactacgaga tgcactgggt gaaacagacc      120
cctgtgcacg gcctgaagtg gatcggcgct ctggacccaa aaaccgggga tacagcatat      180
tcccagaagt ttaaaggaaa ggccactctg accgctgaca agagctcctc tactgcctac      240
atggagctga ggagcctgac atccgaagat agcgccgtgt actattgcac ccgcttctac      300
tcctatacat actggggcca ggggactctg gtgaccgtct ctgcaggagg aggaggctct      360
ggaggaggag ggagtggagg cgggggaagc gacgtggtca tgacacagac tccactgtcc      420
ctgcccgtga gcctgggcca tcaggctagc atttcctgtc gaagttcaca gagtctggtg      480
cactcaaacg gaaataccta tctgcattgg tacctgcaga agccaggcca gtctcccaa      540
ctgctgatct ataaggtgag caaccggttc tccggggtcc ctgacagatt ttctggaagt      600
ggctcagggg cagatttcac tctgaaaatt agcagagtgg aggccgaaga tctgggcgtc      660
tacttttgta gccagaatac ccacgtccca ccaacattcg gaagcggcac taaactggaa      720
atcaag                                           726

```

5

<210> 26

<211> 396

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

<400> 26

```

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
                20              25              30

Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Lys Trp Ile
            35              40              45

Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe
50              55              60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65              70              75              80

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

Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100              105              110

```

ES 2 844 700 T3

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

ES 2 844 700 T3

Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr
370 375 380

Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
385 390 395

<210> 27
<211> 1197
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 27

```
cagggtccagc tgcagcagtc aggagccgaa ctggtgcggc cgggcgcaag tgtcaaactg      60
tcatgcaagg ccagcgggta taccttcaca gactacgaga tgcactgggt gaaacagacc      120
cctgtgcacg gcctgaagtg gatcggcgct ctggacccaa aaaccgggga tacagcatat      180
tcccagaagt ttaaaggaaa ggccactctg accgctgaca agagctcctc tactgcctac      240
atggagctga ggagcctgac atccgaagat agcgccgtgt actattgcac ccgcttctac      300
tcctatacat actggggcca ggggactctg gtgaccgtct ctgcaggagg aggaggctct      360
ggaggaggag ggagtggagg cgggggaagc gacgtggtca tgacacagac tccactgtcc      420
ctgcccgtga gcctgggcga tcaggctagc atttcctgtc gaagttcaca gagtctggtg      480
cactcaaacy gaaataccta tctgcattgg tacctgcaga agccaggcca gtctcccaaa      540
ctgctgatct ataaggtgag caaccggttc tccggggtcc ctgacagatt ttctggaagt      600
ggctcaggga cagatttcac tctgaaaatt agcagagtgg aggccgaaga tctgggcgtc      660
tacttttgta gccagaatac ccacgtccca ccaacattcg gaagcggcac taaactggaa      720
atcaaggagc ccaaattctt tgacaaaact cacacatgcc caccgtgccc ggatccgaaa      780
gatcccaaat tttgggtgct ggtggtggtt ggtggagtcc tggcttgcta tagcttgcta      840
gtaacagtgg cctttattat tagagtgaag ttcagcagga gcgcagacgc ccccgctac      900
cagcagggcc agaaccagct ctataacgag ctcaatctag gacgaagaga ggagtacgat      960
gttttggaac agagacgtgg ccgggaccct gagatggggg gaaagccgag aaggaagaac     1020
cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag aaagataaga tggcggaggc ctacagtga      1080
attgggatga aaggcgagcg ccggaggggc aaggggcacg atggccttta ccagggtctc     1140
agtacagcca ccaaggacac ctacgacgcc cttcacatgc aggcctgcc ccctcgc      1197
```

<210> 28
<211> 440
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 28

ES 2 844 700 T3

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

ES 2 844 700 T3

Pro Asp Pro Lys Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala
260 265 270

Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg
275 280 285

Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro
290 295 300

Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro
305 310 315 320

Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala
325 330 335

Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu
340 345 350

Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly
355 360 365

Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu
370 375 380

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

Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
405 410 415

Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu
420 425 430

His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
435 440

<210> 29
<211> 1329
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 29

cagggtccagc tgcagcagtc aggagccgaa ctggtgcggc ccggcgcaag tgtcaaactg 60
tcatgcaagg ccagcgggta taccttcaca gactacgaga tgcactgggt gaaacagacc 120
cctgtgcacg gcctgaagtg gatcggcgct ctggacccaa aaaccgggga tacagcatat 180
tcccagaagt ttaaaggaaa ggccactctg accgctgaca agagctcctc tactgcctac 240

ES 2 844 700 T3

```

atggagctga ggagcctgac atccgaagat agcgccgtgt actattgcac ccgcttctac      300
tcctatacat actggggcca ggggactctg gtgaccgtct ctgcaggagg aggaggctct      360
ggaggaggag ggagtggagg cgggggaagc gacgtggtca tgacacagac tccactgtcc      420
ctgcccgtga gcctgggcga tcaggctagc atttcctgtc gaagttcaca gagtctggtg      480
cactcaaacg gaaataccta tctgcattgg tacctgcaga agccaggcca gtctcccaaa      540
ctgctgatct ataaggtgag caaccggttc tccggggtcc ctgacagatt ttctggaagt      600
ggctcaggga cagatttcac tctgaaaatt agcagagtgg aggccgaaga tctgggcgtc      660
tacttttgta gccagaatac ccacgtccca ccaacattcg gaagcggcac taaactggaa      720
atcaaggagc ccaaattctt tgacaaaact cacacatgcc caccgtgccc ggatccgaaa      780
gatcccaaat tttgggtgct ggtggtggtt ggtggagtcc tggcttgcta tagcttgcta      840
gtaacagtgg cctttattat tttctgggtg aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt      900
gactacatga acatgactcc ccgccgcccc gggcccaccc gcaagcatta ccagccctat      960
gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc tccagagtga agttcagcag ggcgcagac     1020
gcccccgct accagcaggg ccagaaccag ctctataacg agtcaatct aggacgaaga     1080
gaggagtacg atgttttgga caagagacgt ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg     1140
agaaggaaga accctcagga aggcctgtac aatgaactgc agaaagataa gatggcggag     1200
gcctacagtg agattgggat gaaaggcgag cgccggaggg gcaaggggca cgatggcctt     1260
taccagggtc tcagtacagc caccaaggac acctacgacg cccttcacat gcaggccctg     1320
ccccctcgc                                     1329

```

<210> 30
 <211> 438
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 30

```

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20          25          30

Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Lys Trp Ile
35          40          45

Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe
50          55          60

```


ES 2 844 700 T3

Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	
65					70					75					80	
Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
Thr	Arg	Phe	Tyr	Ser	Tyr	Thr	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	
			100					105					110			
Val	Ser	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	
		115					120					125				
Gly	Ser	Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	
	130					135					140					
Leu	Gly	Asp	Gln	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	
145					150					155					160	
His	Ser	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	
				165					170					175		
Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	
			180					185					190			
Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	
		195					200					205				
Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Phe	Cys	Ser	
	210					215					220					
Gln	Asn	Thr	His	Val	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	
225					230					235					240	
Ile	Lys	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	
				245					250					255		
Pro	Asp	Pro	Lys	Phe	Trp	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val	Leu	Ala	
			260					265					270			
Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Lys	Arg	Gly	Arg	
		275					280					285				
Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	
	290					295					300					
Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	
305					310					315					320	

ES 2 844 700 T3

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

Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
340 345 350

Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp
355 360 365

Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu
370 375 380

Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile
385 390 395 400

Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
405 410 415

Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
420 425 430

Gln Ala Leu Pro Pro Arg
435

<210> 31
<211> 1323
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 31

ES 2 844 700 T3

cagggtccagc tgcagcagtc aggagccgaa ctggtgcggc cggcgcaag tgtcaaactg	60
tcatgcaagg ccagcgggta taccttcaca gactacgaga tgactgggt gaaacagacc	120
cctgtgcacg gcctgaagtg gatcggcgct ctggacccaa aaaccgggga tacagcatat	180
tcccagaagt ttaaaggaaa ggccactctg accgctgaca agagctcctc tactgcctac	240
atggagctga ggagcctgac atccgaagat agcgccgtgt actattgcac ccgcttctac	300
tcctatacat actggggcca ggggactctg gtgaccgtct ctgcaggagg aggaggctct	360
ggaggaggag ggagtggagg cgggggaagc gacgtggtca tgacacagac tccactgtcc	420
ctgcccgtga gcctgggcga tcaggctagc atttcctgtc gaagttcaca gagtctggtg	480
cactcaaacg gaaataccta tctgcattgg tacctgcaga agccaggcca gtctcccaa	540
ctgctgatct ataaggtgag caaccggttc tccggggtcc ctgacagatt ttctggaagt	600
ggctcaggga cagatttcac tctgaaaatt agcagagtgg aggccgaaga tctgggcgtc	660
tacttttgta gccagaatac ccacgtccca ccaacattcg gaagcggcac taaactggaa	720
atcaaggagc ccaaactctg tgacaaaact cacacatgcc caccgtgccc ggatccgaaa	780
gatcccaaat tttgggtgct ggtggtggtt ggtggagtcc tggcttgcta tagcttgcta	840
gtaacagtgg cctttattat taaacggggc agaaagaaac tcctgtatat attcaaaca	900
ccatttatga gaccagtaca aactactcaa gaggaagatg gctgtagctg ccgatttcca	960
gaagaagaag aaggaggatg tgaactgaga gtgaagtcca gcaggagcgc agacgcccc	1020
gcgtaccagc agggccagaa ccagctctat aacgagctca atctaggacg aagagaggag	1080
tacgatgttt tggacaagag acgtggccgg gaccctgaga tggggggaaa gccgagaagg	1140
aagaaccctc aggaaggcct gtacaatgaa ctgcagaaag ataagatggc ggaggcctac	1200
agtgagattg ggatgaaagg cgagcgccgg aggggcaagg ggcacgatgg cctttaccag	1260
ggtctcagta cagccaccaa ggacacctac gacgcccttc acatgcaggc cctgccccct	1320
cgc	1323

<210> 32
 <211> 482
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 32

ES 2 844 700 T3

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

130					135					140					
Leu 145	Gly	Asp	Gln	Ala	Ser 150	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser 155	Ser	Gln	Ser	Leu	Val 160
His	Ser	Asn	Gly	Asn 165	Thr	Tyr	Leu	His	Trp 170	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro 175	Gly
Gln	Ser	Pro	Lys 180	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys 185	Val	Ser	Asn	Arg	Phe 190	Ser	Gly
Val	Pro	Asp 195	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser 200	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp 205	Phe	Thr	Leu
Lys	Ile 210	Ser	Arg	Val	Glu	Ala 215	Glu	Asp	Leu	Gly	Val 220	Tyr	Phe	Cys	Ser
Gln 225	Asn	Thr	His	Val	Pro 230	Pro	Thr	Phe	Gly	Ser 235	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu 240
Ile	Lys	Glu	Pro	Lys 245	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr 250	His	Thr	Cys	Pro	Pro 255	Cys
Pro	Asp	Pro	Lys 260	Phe	Trp	Val	Leu	Val 265	Val	Val	Gly	Gly	Val 270	Leu	Ala
Cys	Tyr	Ser 275	Leu	Leu	Val	Thr	Val 280	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe 285	Trp	Val	Arg
Ser	Lys 290	Arg	Ser	Arg	Leu	Leu 295	His	Ser	Asp	Tyr	Met 300	Asn	Met	Thr	Pro
Arg 305	Arg	Pro	Gly	Pro	Thr 310	Arg	Lys	His	Tyr	Gln 315	Pro	Tyr	Ala	Pro	Pro 320
Arg	Asp	Phe	Ala	Ala 325	Tyr	Arg	Ser	Lys	Arg 330	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu 335	Leu
Tyr	Ile	Phe 340	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg 345	Pro	Val	Gln	Thr	Thr 350	Gln	Glu
Glu	Asp	Gly 355	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe 360	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu 365	Gly	Gly	Cys
Glu	Leu 370	Arg	Val	Lys	Phe	Ser 375	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala 380	Pro	Ala	Tyr	Gln

ES 2 844 700 T3

Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu
385 390 395 400

Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly
405 410 415

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

Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly
435 440 445

Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser
450 455 460

Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro
465 470 475 480

Pro Arg

<210> 33

<211> 1455

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 33

ES 2 844 700 T3

caggtccagc tgcagcagtc aggagccgaa ctggtgcggc cggcgcaag tgtcaaactg	60
tcatgcaagg ccagcgggta taccttcaca gactacgaga tgcactgggt gaaacagacc	120
cctgtgcacg gcctgaagtg gatcggcgct ctggacccaa aaaccgggga tacagcatat	180
tcccagaagt ttaaaggaaa ggccactctg accgctgaca agagctcctc tactgcctac	240
atggagctga ggagcctgac atccgaagat agcgccgtgt actattgcac ccgcttctac	300
tcctatacat actggggcca ggggactctg gtgaccgtct ctgcaggagg aggaggctct	360
ggaggaggag ggagtggagg cgggggaagc gacgtggtca tgacacagac tccactgtcc	420
ctgcccgtga gcctgggcga tcaggctagc atttcctgtc gaagttcaca gagtctggtg	480
cactcaaacg gaaataccta tctgcattgg tacctgcaga agccaggcca gtctccaaa	540
ctgctgatct ataaggtgag caaccggttc tccggggtcc ctgacagatt ttctggaagt	600
ggctcagggg cagatttcac tctgaaaatt agcagagtgg aggccgaaga tctgggcgtc	660
tacttttgta gccagaatac ccacgtccca ccaacattcg gaagcggcac taaactggaa	720
atcaaggagc ccaaattctt tgacaaaact cacacatgcc caccgtgcc ggatccgaaa	780
gatcccaaat tttgggtgct ggtggtggtt ggtggagtcc tggcttgcta tagcttgcta	840
gtaacagtgg cttttattat tttctgggtg aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt	900
gactacatga acatgactcc ccgcccccc gggcccaccc gcaagcatta ccagccctat	960
gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc tccaaacggg gcagaaagaa actcctgtat	1020
atattcaaac aaccatttat gagaccagta caaactactc aagaggaaga tggctgtagc	1080
tgccgatttc cagaagaaga agaaggagga tgtgaactga gagtgaagtt cagcaggagc	1140
gcagacgccc ccgcgtacca gcagggccag aaccagctct ataacgagct caatctagga	1200
cgaagagagg agtacgatgt tttggacaag agacgtggcc gggaccctga gatgggggga	1260
aagccgagaa ggaagaaccc tcaggaaggc ctgtacaatg aactgcagaa agataagatg	1320
gcggaggcct acagtgagat tgggatgaaa ggcgagcgcc ggaggggcaa ggggcacgat	1380
ggcctttacc aggtctcag tacagccacc aaggacacct acgacgcct tcacatgcag	1440
gcctgcccc ctgc	1455

REIVINDICACIONES

1. Linfocitos T citolíticos naturales (NKT) que expresan un receptor quimérico de antígeno (CAR) que se dirige a glipicano-3 (GPC3) para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad asociada con proliferación y/o actividad de células GPC3 positivas en un individuo, comprendiendo el método la etapa de poner en contacto las células con una cantidad terapéuticamente eficaz de los linfocitos NKT, y comprendiendo el CAR (i) un anticuerpo scFv distinto de 3E11, 2G9, 4G5, 3D8 o 2E10, (ii) un dominio coestimulante CD28 y (iii) un dominio coestimulante 4-1BB, en los que:
 - 5 (a) los linfocitos NKT portan un polinucleótido que codifica el CAR y comprende SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 33, o una combinación de las mismas; y/o
 - 10 (b) el CAR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 32, o una combinación de las mismas; en los que la enfermedad es cáncer o síndrome de Simpson-Golabi-Behmel.
2. Los linfocitos NKT para el uso de la reivindicación 1, en los que las células GPC3 positivas son células cancerosas y:
 - 15 (a) el cáncer es cáncer de hígado, sarcoma embrionario, tumor rabdoide, tumor de Wilms, coriocarcinoma o tumor del saco vitelino; o
 - 20 (b) dichas células cancerosas no son células de carcinoma hepatocelular.
3. Los linfocitos NKT para el uso de la reivindicación 1 o 2, en los que:
 - 25 (a) dicho contacto se realiza *in vitro*; o
 - (b) dicho contacto se realiza en cultivo celular.
4. Los linfocitos NKT para el uso de la reivindicación 1 o 2, en los que dicho contacto se realiza *in vivo*.
5. Los linfocitos NKT para el uso de la reivindicación 4, en los que:
 - 30 (a) dichos linfocitos NKT son autólogos para el individuo; o
 - (b) dichos linfocitos NKT son alogénicos para el individuo.
6. Los linfocitos NKT para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3(b), 4 y 5, en los que las células GPC3 positivas son células cancerosas, en los que además el individuo ha recibido, está recibiendo o recibirá un tratamiento adicional contra el cáncer.
7. Los linfocitos NKT para el uso de la reivindicación 6, en los que el tratamiento adicional contra el cáncer comprende quimioterapia, inmunoterapia, radiación, cirugía, hormonoterapia o una combinación de los mismos.
8. Los linfocitos NKT para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en los que el polinucleótido comprende además un gen suicida.

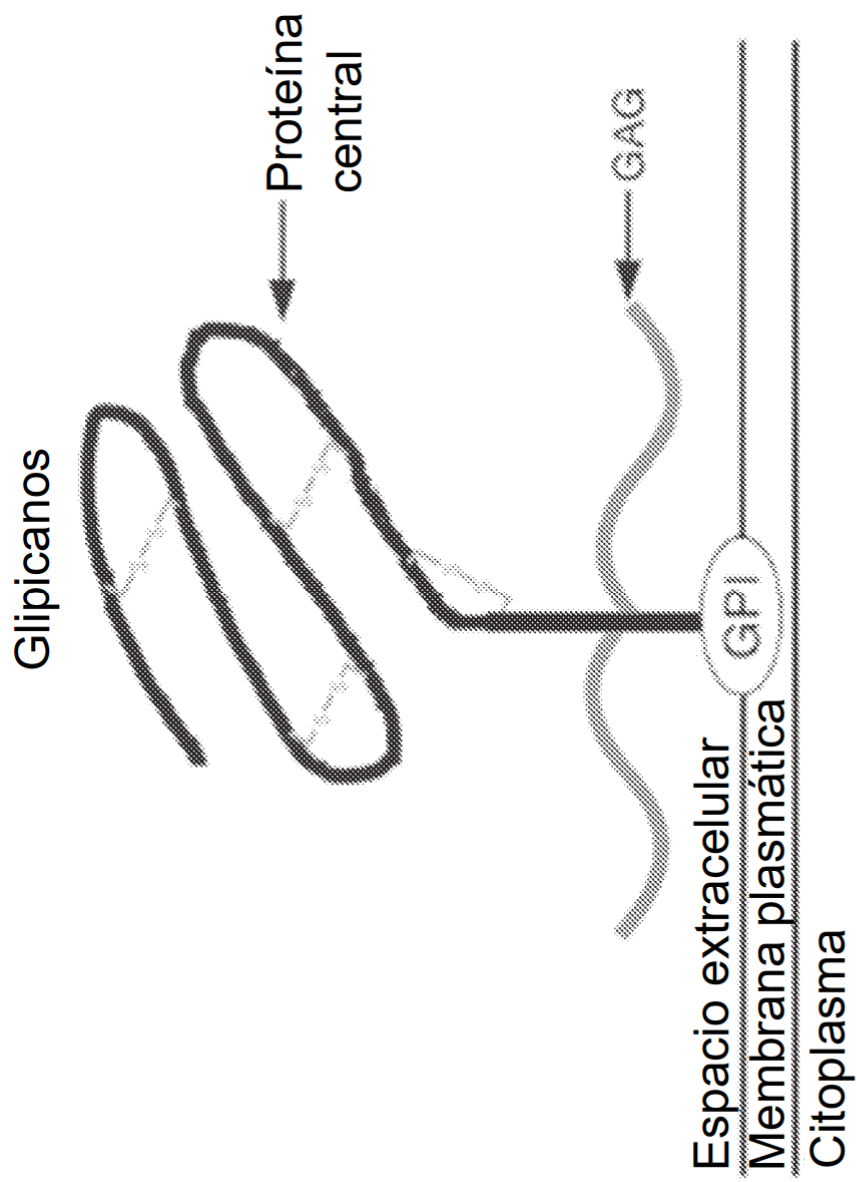


FIG. 1

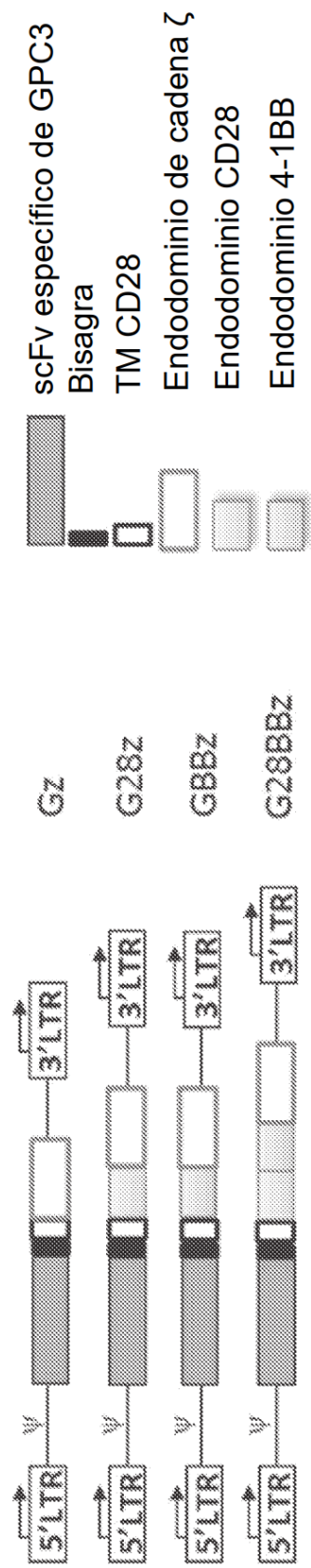


FIG. 2

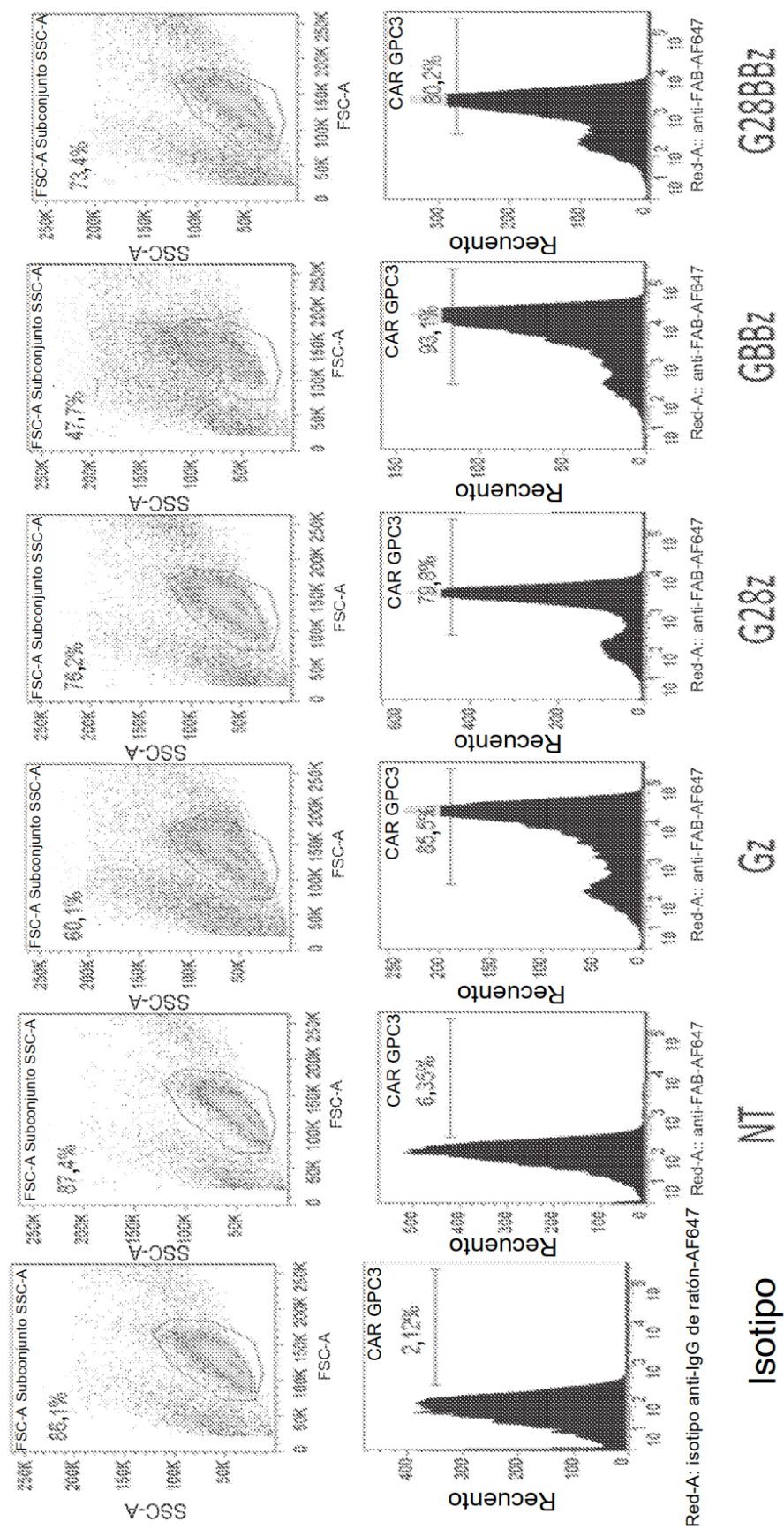


FIG. 3

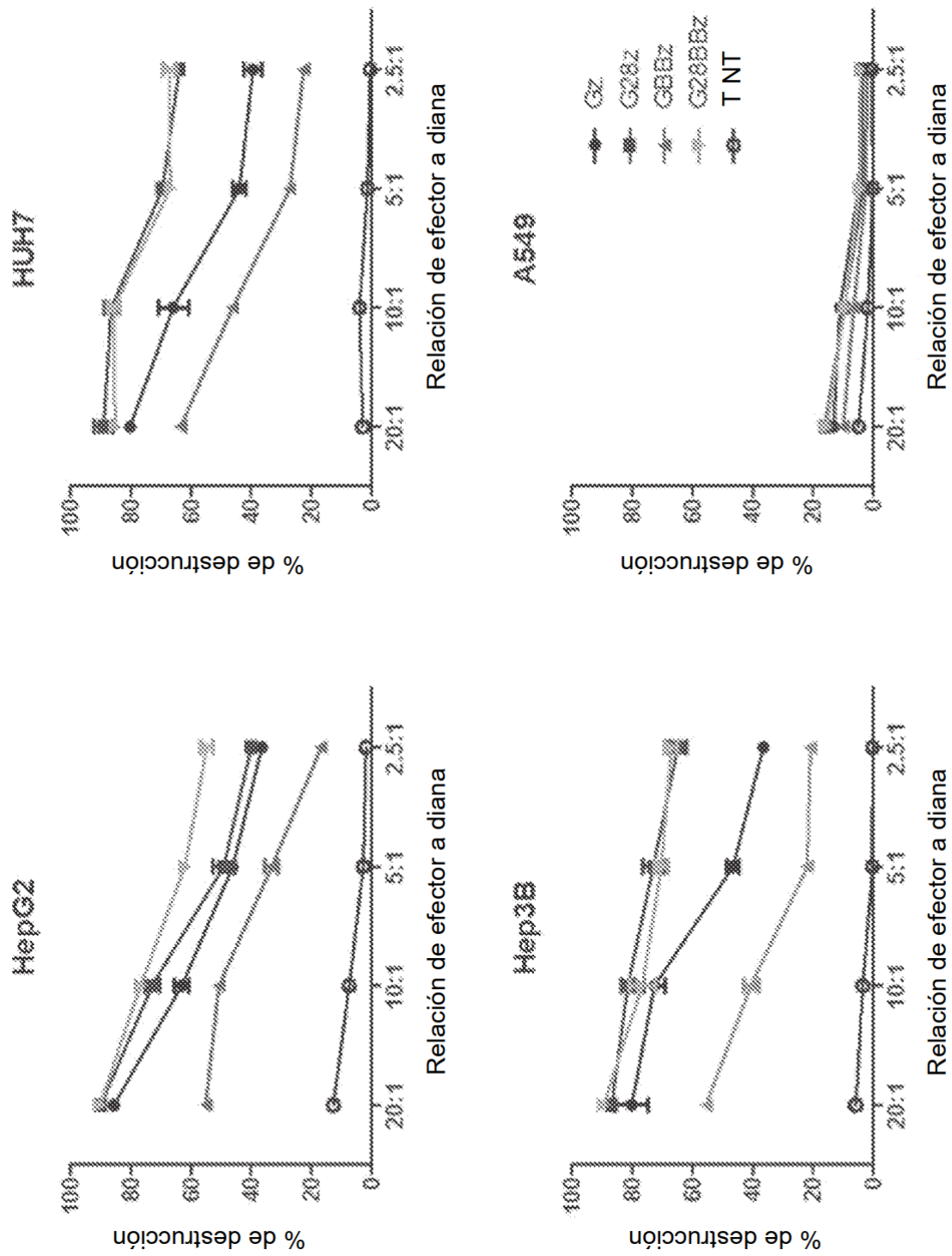


FIG. 4

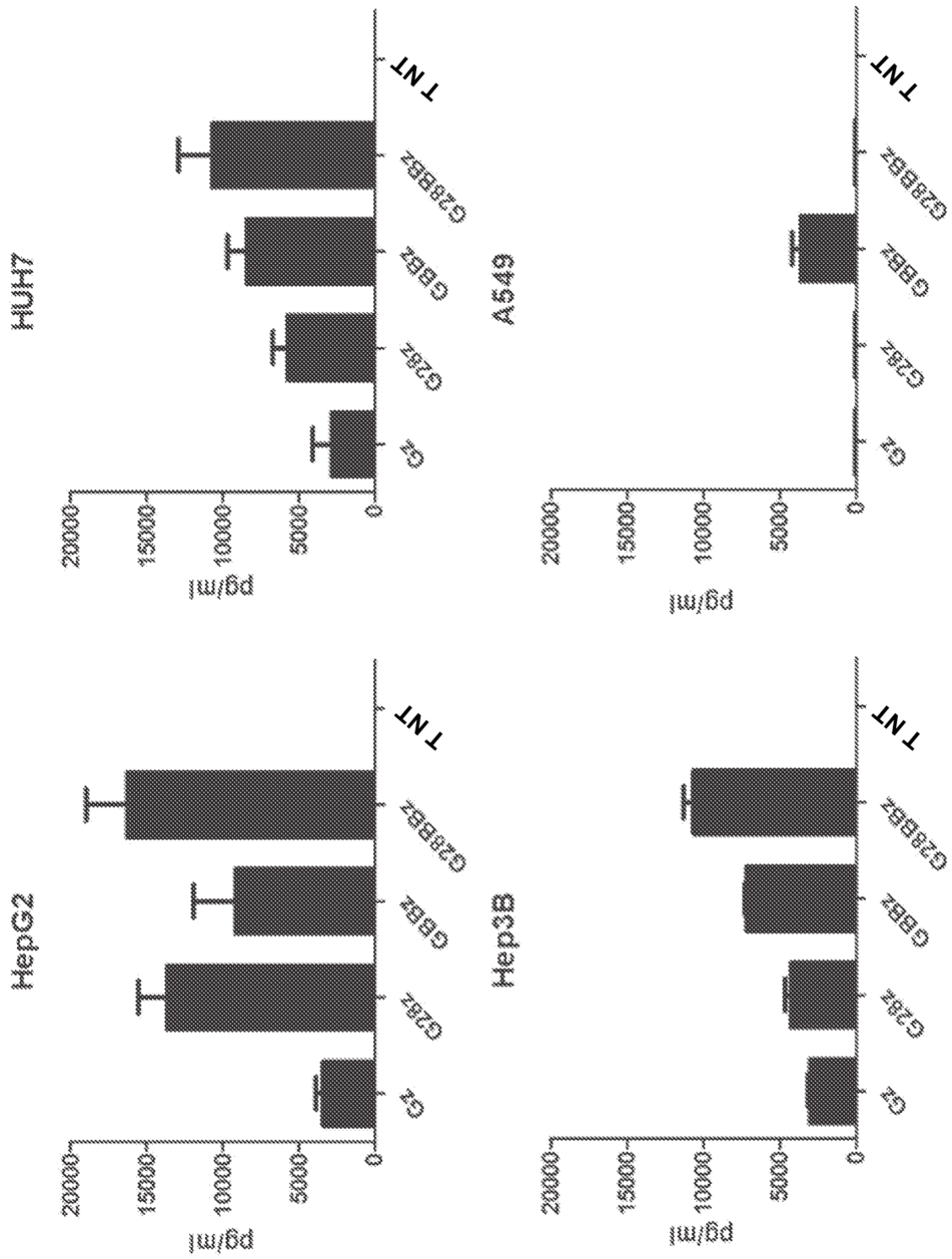


FIG. 5

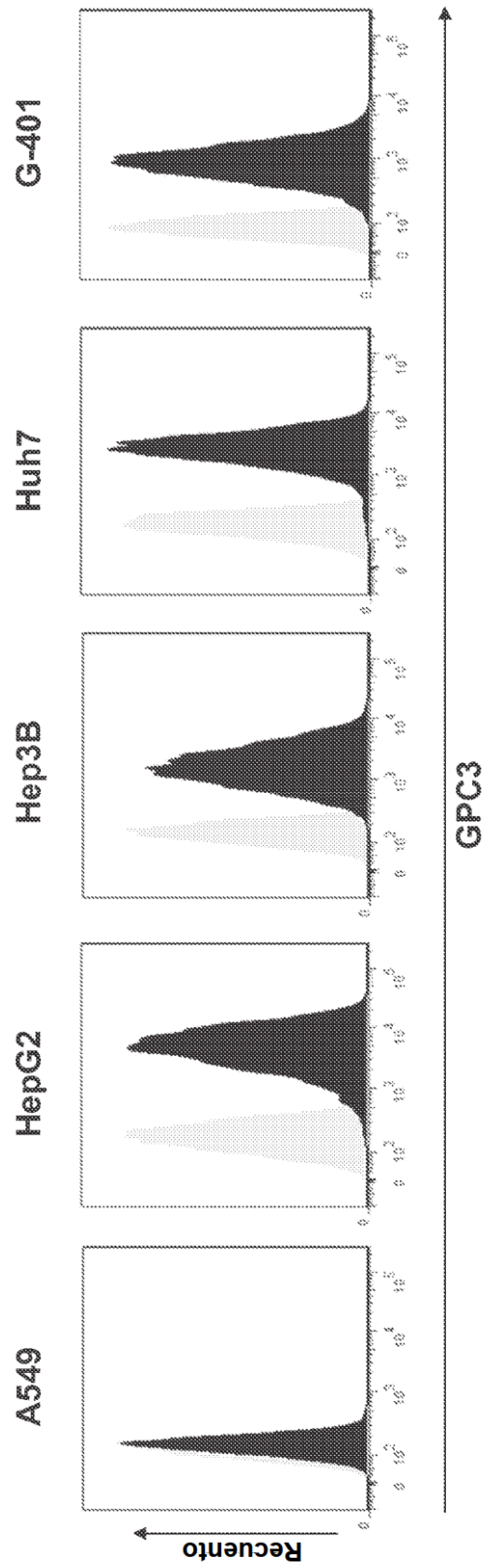
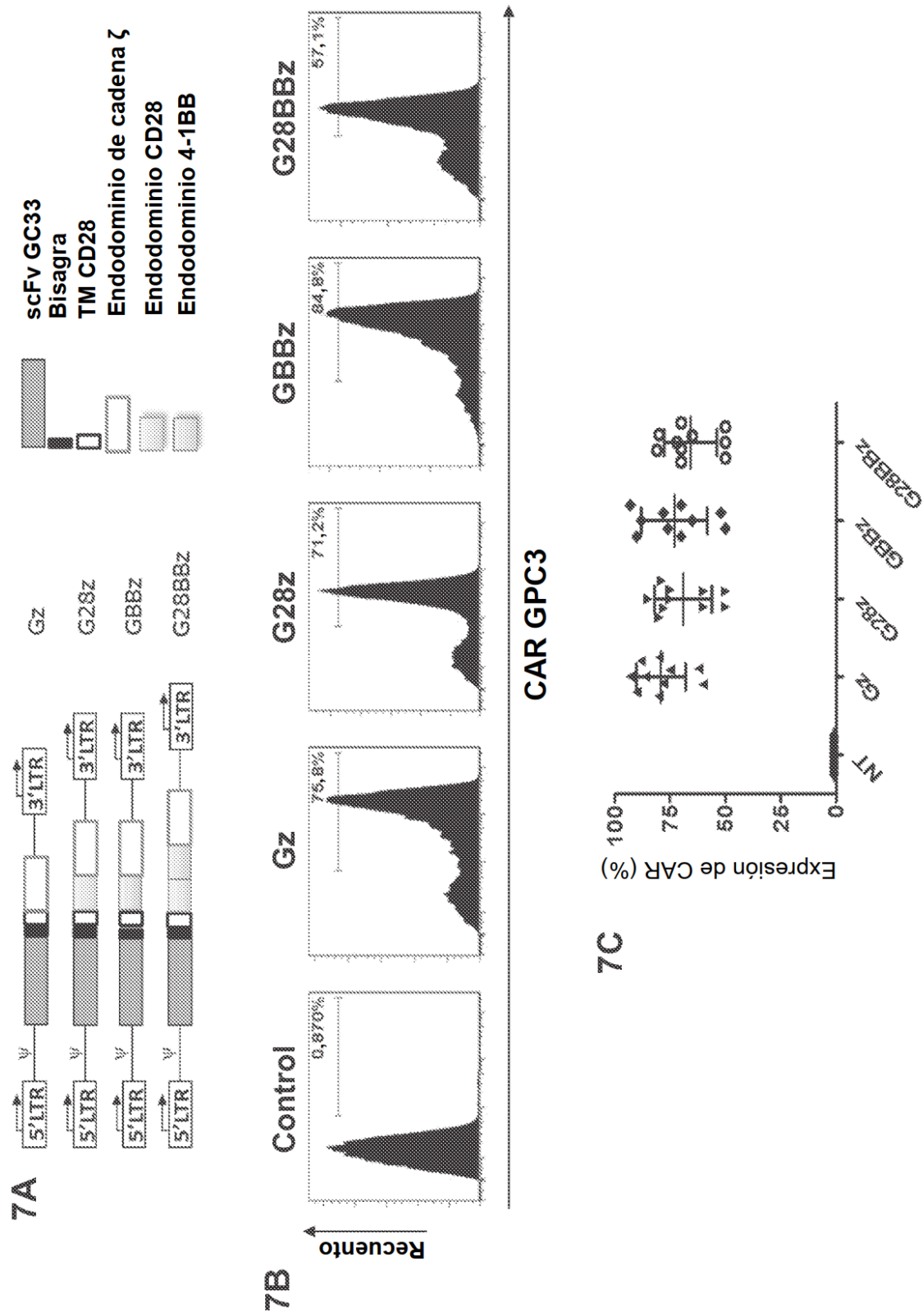
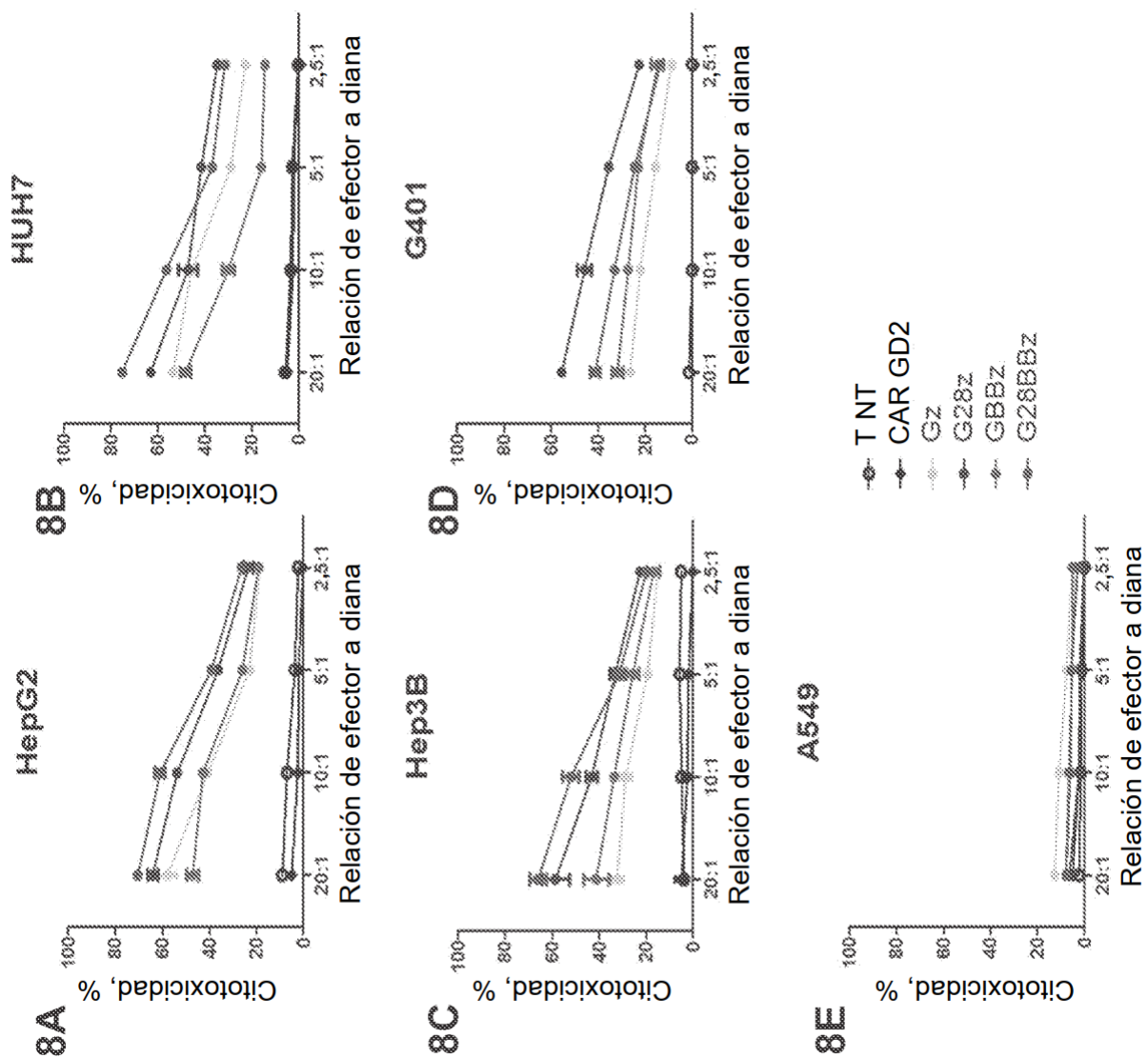
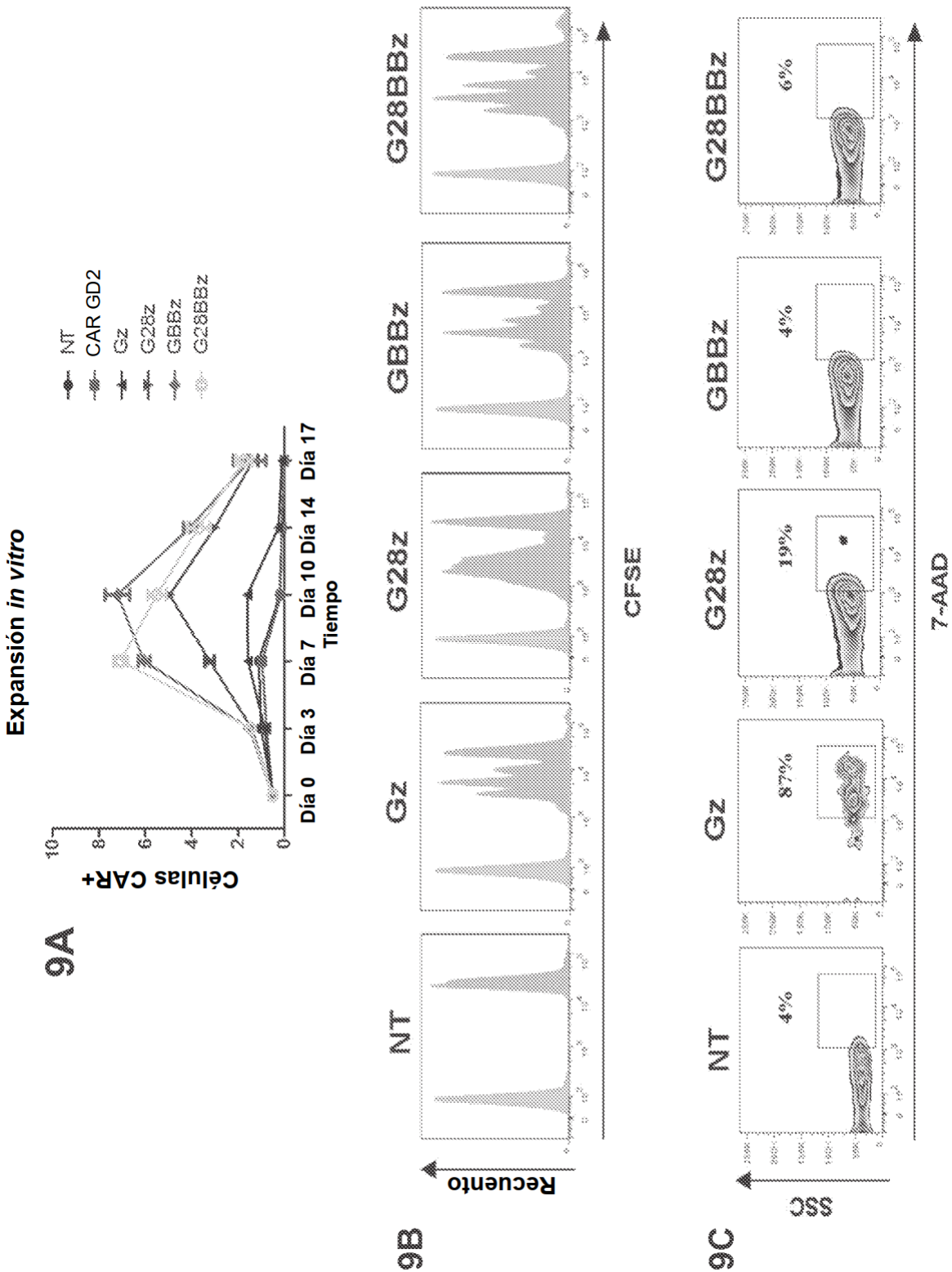


FIG. 6

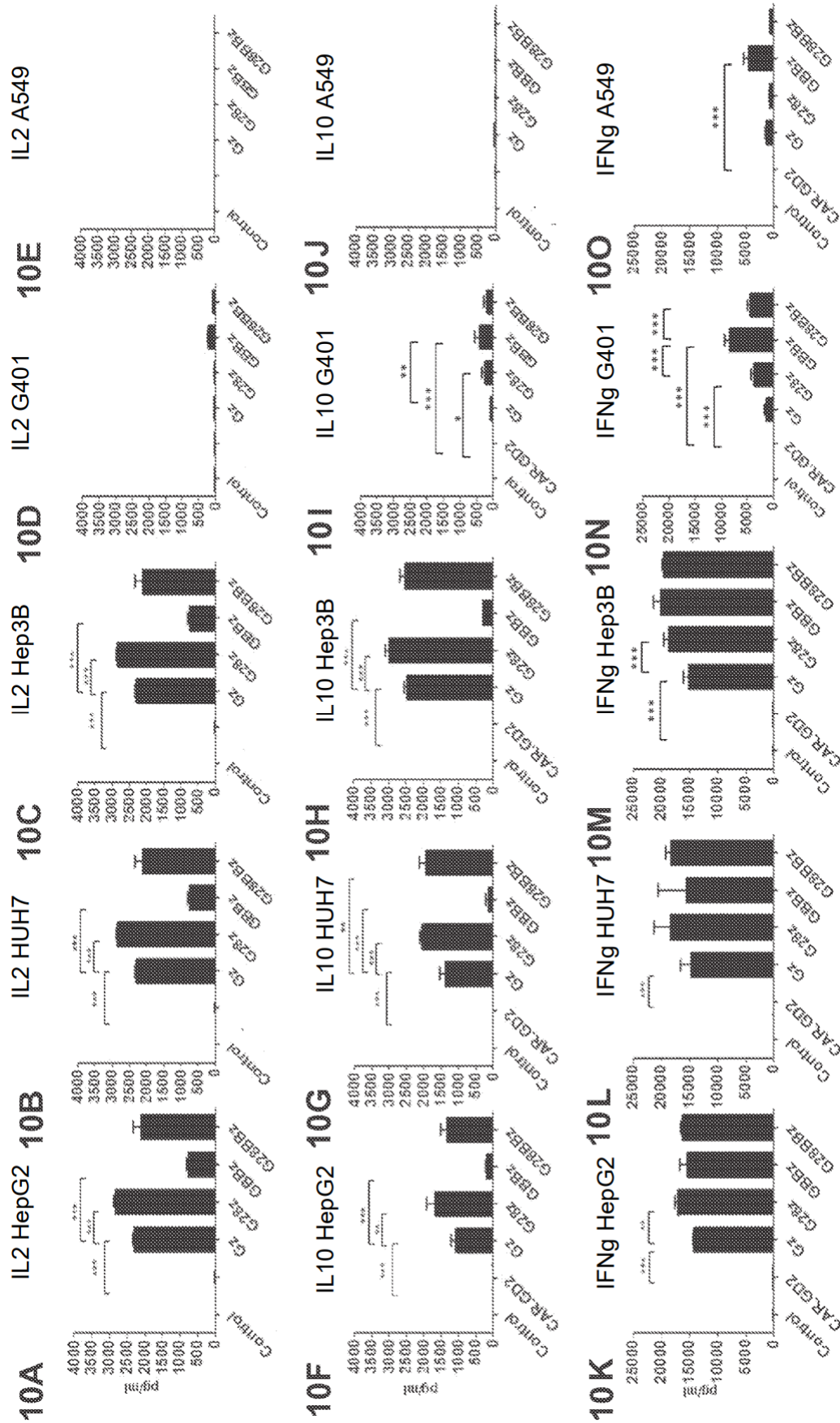




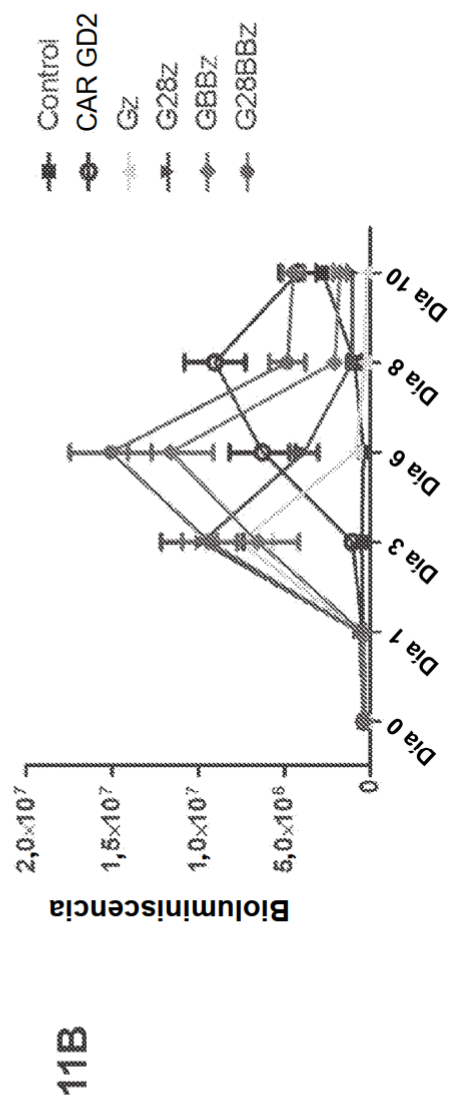
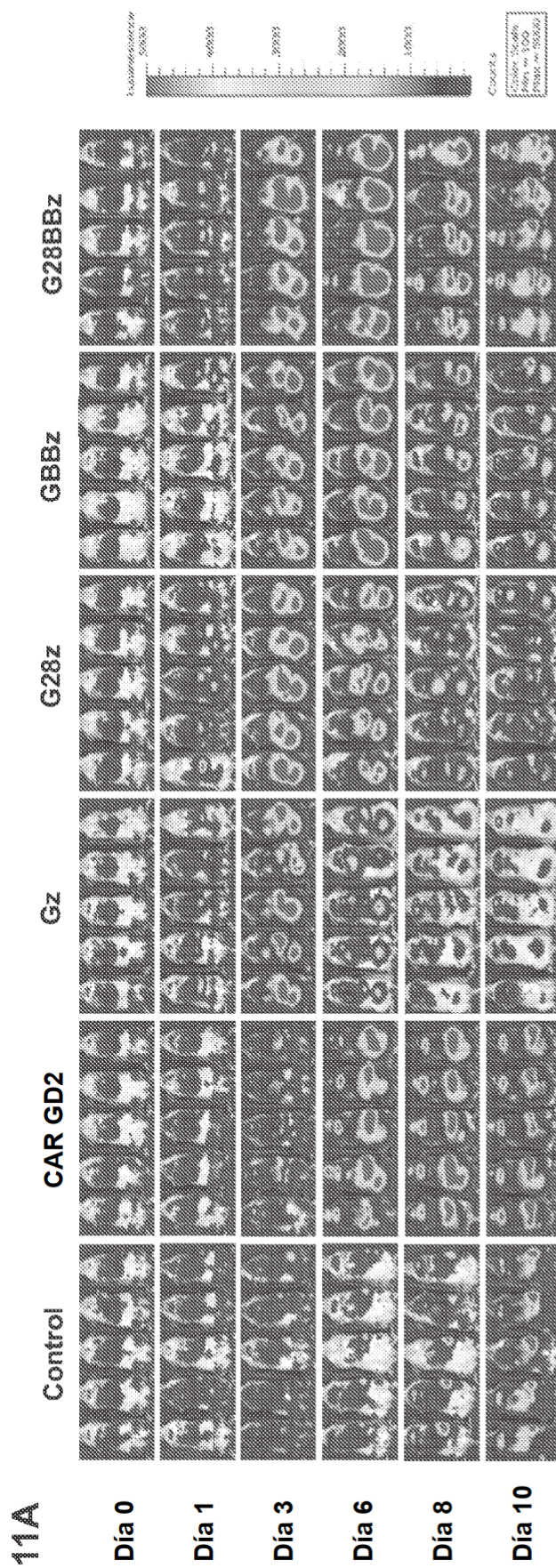
FIGS. 8A-8E



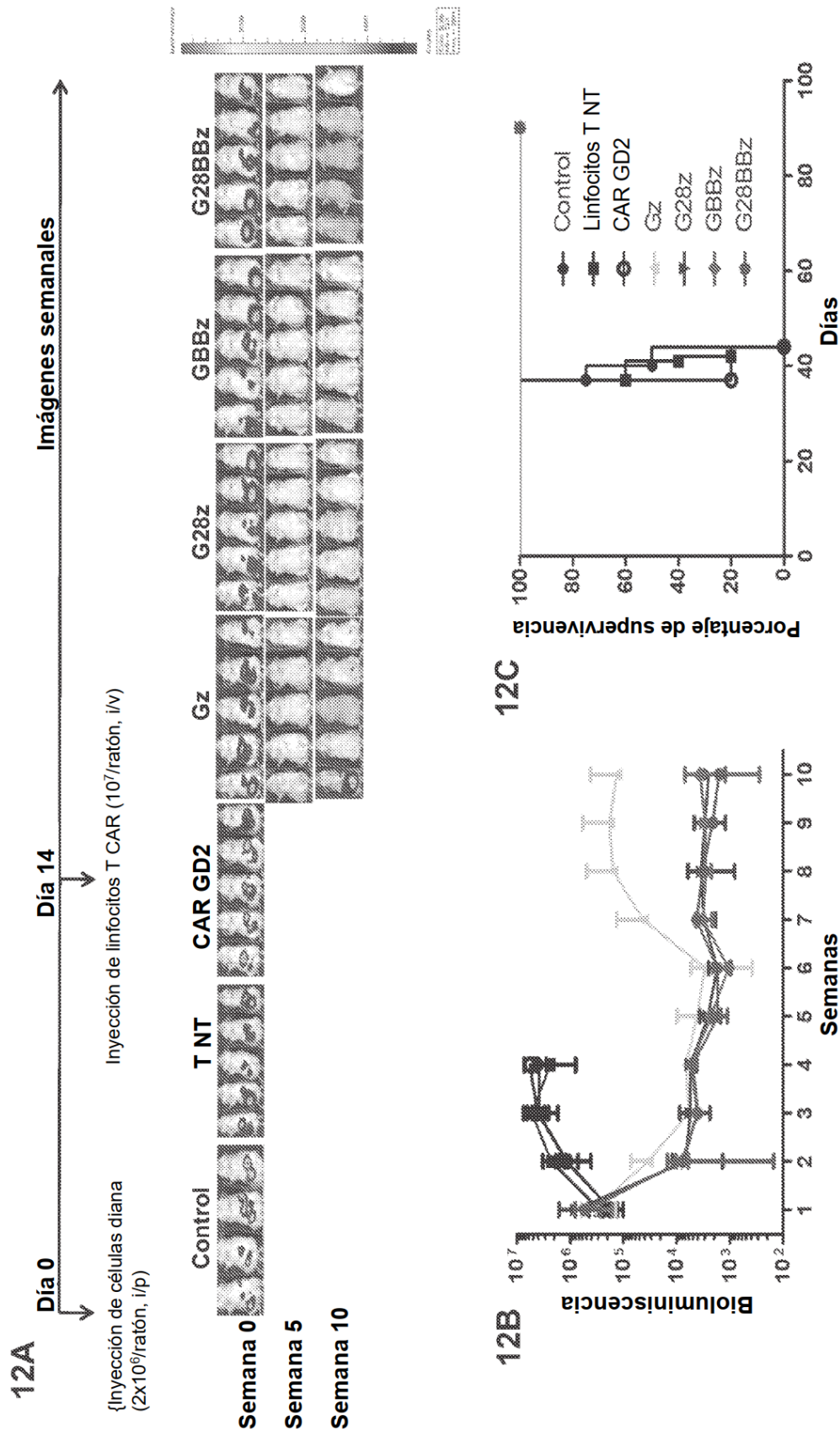
FIGS. 9A-9C



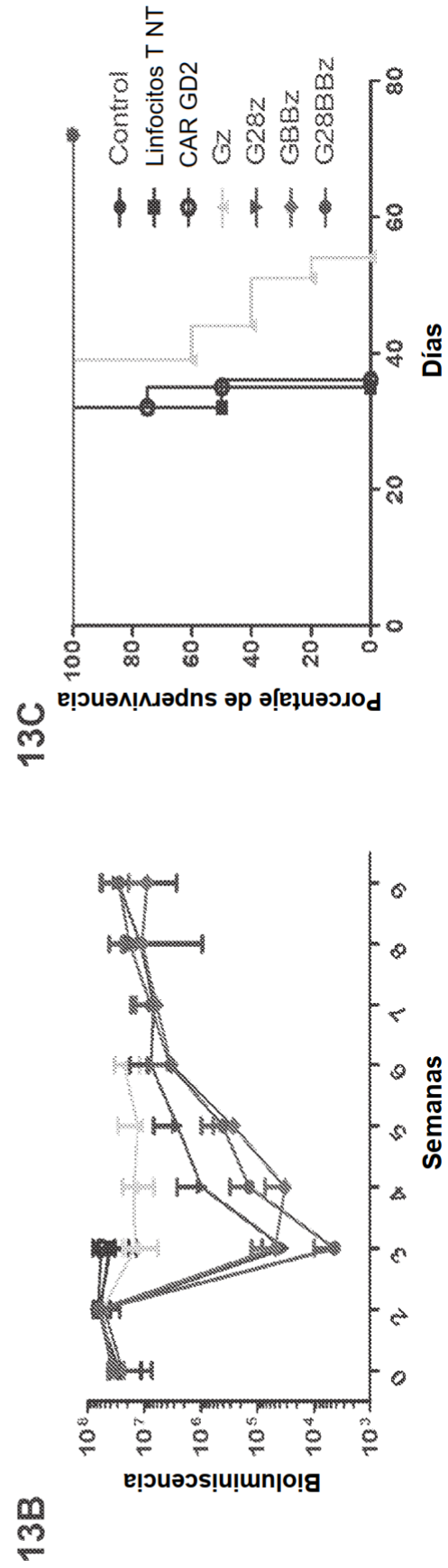
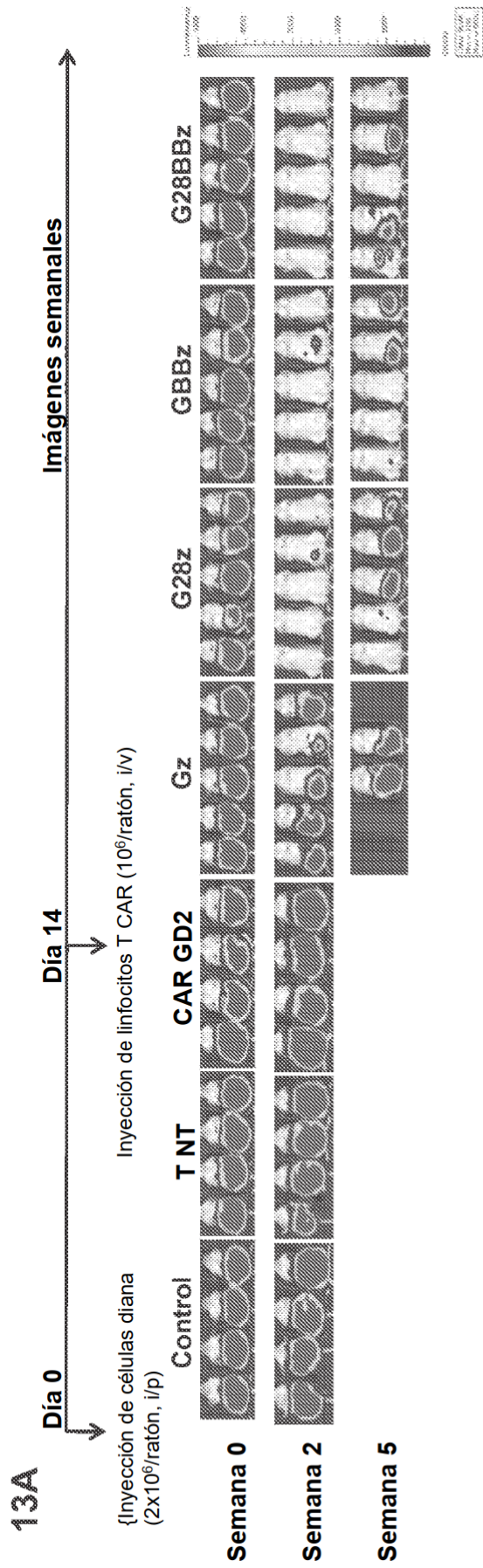
FIGS. 10A-100



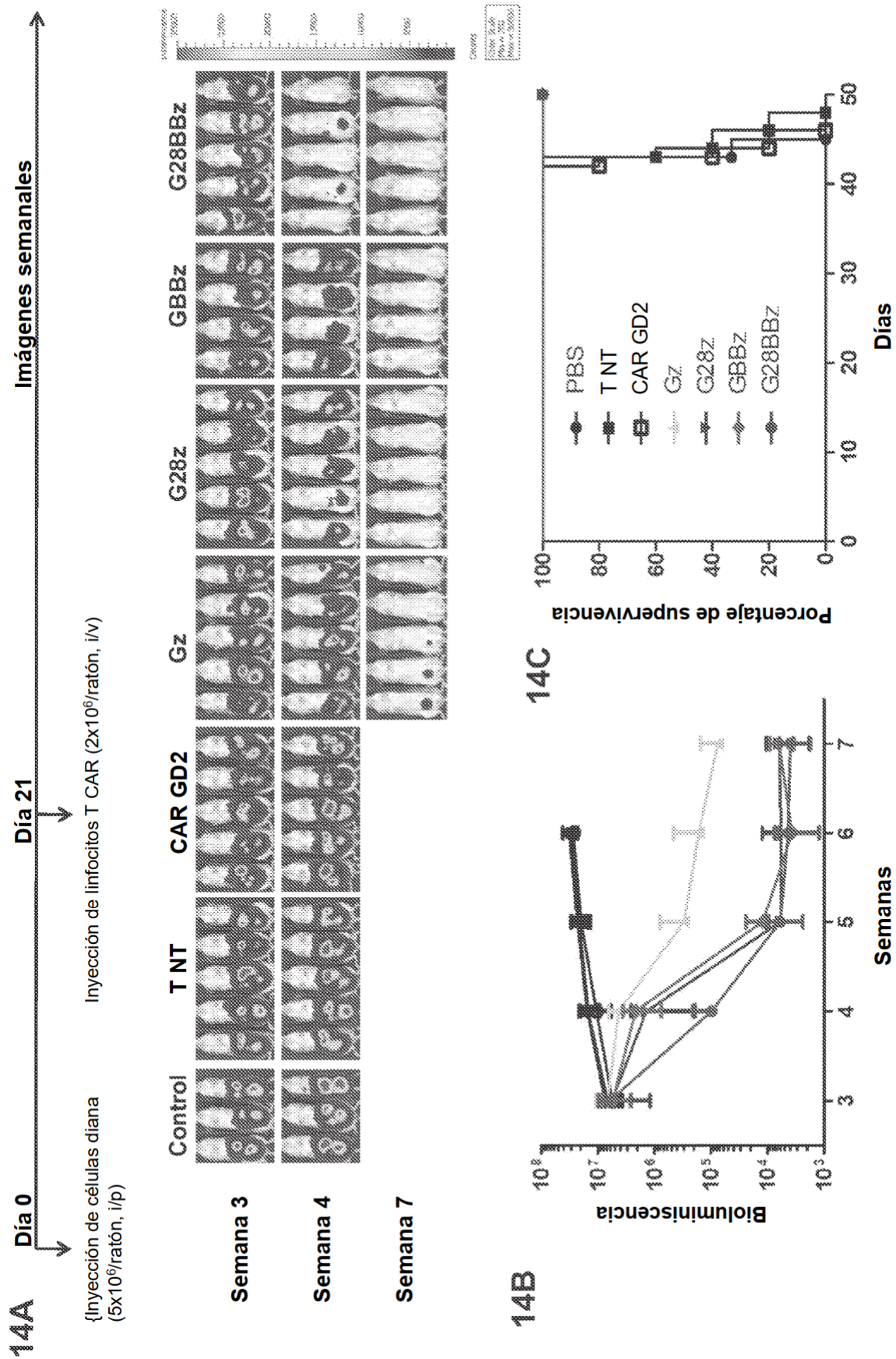
FIGS. 11A y 11B



FIGS. 12A-12C



FIGS. 13A-13C



FIGS. 14A-14C

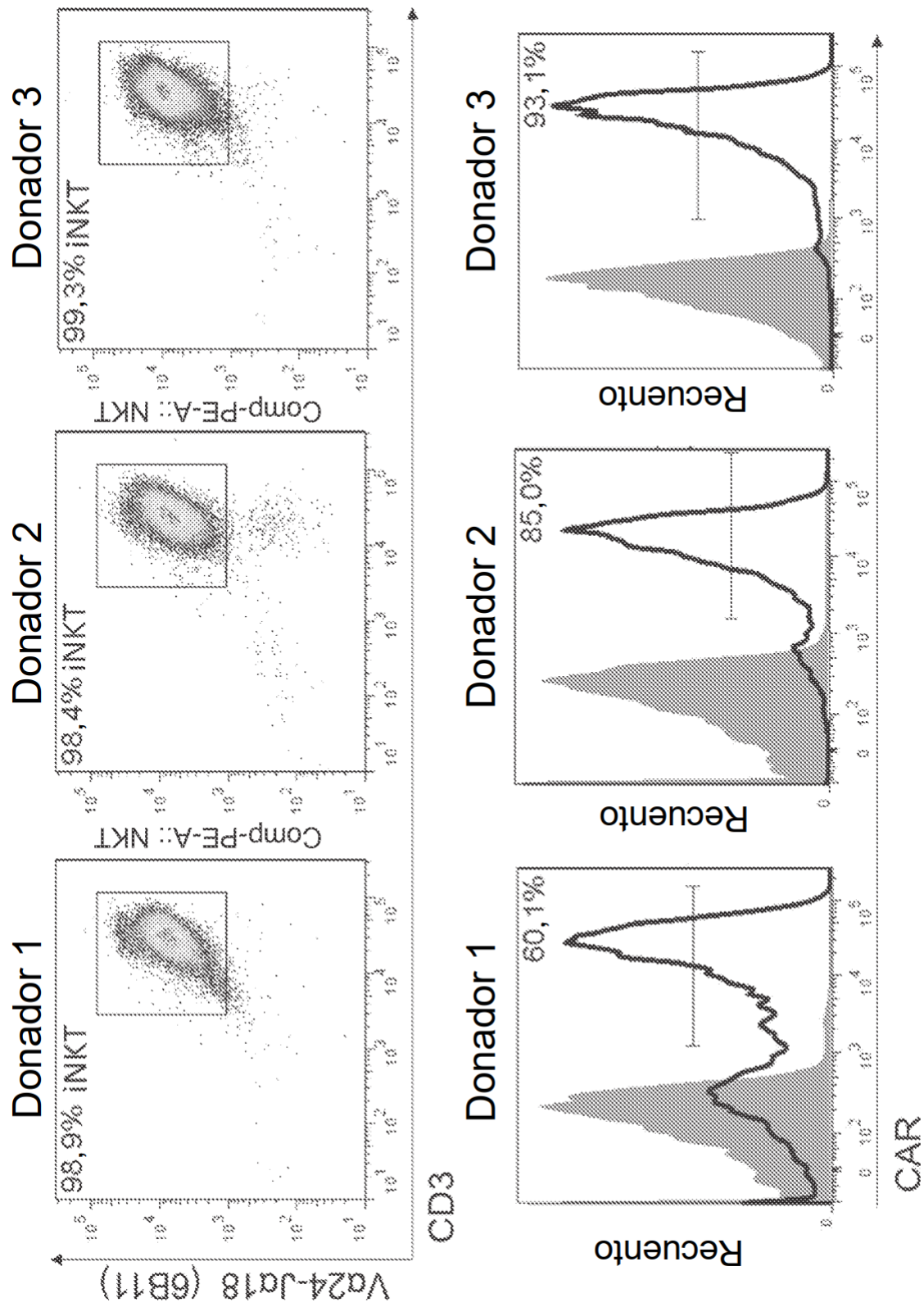


FIG. 15