

(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 químéricos 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- $\zeta$  del receptor de linfocitos T a menudo ligado a endodominiós de molécula coestimulante.

20 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 rhabdoides atípicos (ATRT), el 38-75 % de tumor de Wilms (WT), el 67 % de tumores rhabdoides 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.

30 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 40 un receptor químico 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 epítopo 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 químico 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 50 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 químico 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 químicos de antígeno.

**Breve sumario de la divulgación**

60 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 rhabdoides 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 químico 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 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 endodomios 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, CD8a, 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, 20 CD8a, CD4 o 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 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 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.

30 Otro aspecto descrito en el presente documento proporciona 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 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 γδT 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 γδ-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.

50 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 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 significativa de GPC3 en tejidos normales resalta adicionalmente su relevancia para inmunoterapia.

60 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 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 derivado 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抗genos específicos (por ejemplo,抗genos 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 endodomelios 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 Cr<sup>51</sup> se muestra a las relaciones indicadas de efecto a diana para linfocitos T CAR GPC3 y linfocitos T no transducidos. NT: linfocito T no transducido. Dianas GPC3<sup>pos</sup>: HepG2, HUH7 y Hep3B. Diana GPC3<sup>neg</sup> A549;
- la figura 5 muestra la liberación de IFNy de linfocitos T CAR GPC3: se muestran los niveles de IFNy en pg/ml de linfocitos T CAR GPC3 después de 24 horas de cocultivo con dianas GPC3<sup>pos</sup> y GPC3<sup>neg</sup>. NT: linfocito T no transducido. Dianas GPC3<sup>pos</sup>: HepG2, HUH7 y Hep3B. Diana GPC3<sup>neg</sup> 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 endodomelios 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);

- 5 las figuras 9A-9C muestran que los linfocitos T CAR GPC3 proliferan tras la exposición a células GPC3<sup>pos</sup>. 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;
- 10 las figuras 10A-10O demuestran la secreción de citocinas por los linfocitos T CAR GPC3 en presencia de células GPC3<sup>pos</sup>. 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 IFNy en presencia de células HepG2 (10K); células HUH7 (10L); células Hep3B (10M); G401 (10N) y células A549 de control (10O)
- 15 15 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).
- 20 20 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.
- 25 25 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.
- 30 30 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.
- 35 35 Figura 15. Generación de linfocitos NKT CAR GPC3. Se aislaron NKT de PBMC de 3 donadores sanos, se estimularon con aGalCer, se transdijeron con vector retrovírico 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 iNKT), mAb anti-CD3 y anti-CAR
- Descripción detallada de la divulgación**
- 40 40 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.
- 45 45 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.
- 50 50 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.
- 55 55 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 rhabdoides 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.
- 60 60 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.
- 65 65 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 inmunicitos 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 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.

10 15 En casos particulares, los inmunicitos 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 coestimulantes, por ejemplo, endodominiós de moléculas coestimulantes. En aspectos específicos descritos en el presente documento, el anticuerpo es un scFv.

20 25 30 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 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, endodominiós 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 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.

35 40 45 El CAR puede ser de primera generación, segunda generación o tercera generación (CAR en que la señalización se proporciona por CD3ζ 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 descritos en el presente documento una célula que expresa el CAR específico de GPC3 también puede expresar un segundo CAR dirigido a otra 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 α2 de IL-13, receptor R α de IL-11, MUC1, MUC16, CA9, GD2, GD3, HMW-MAA, CD171, Lewis Y, G250/CAIX, HLA-A1 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.

50 55 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 endodominiós 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.

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):

MDWIWRILFLVGAATGAHSQVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTDYEM  
 HWVKQTPVHGLKWIGALDPKTGDTAYSQKFKGKATLTADKSSSTA  
 VYYCTRFYSYTYWGQQGTLTVSAGGGGGGGGGGGSDVVMTQTPLSLPVSLGDQA  
 SISCRSSQSLVHSNGNTYLNWYLNQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI  
 SRVEAEDLGVYFCSQNTHVPPTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:1)

55

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

QVQLQQSGAELVRPGASVKSCKASGYTFTDYEMHWVKQTPVHGLKWIGA  
LDPKTGDTAYSQKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTRFYSYTYWGQG  
TLVTVSAGGGGGGGGGGGGGSDVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTY  
LHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRSGVPDRFSGSGSTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQNT  
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

ATGGATTGGATTGGCGCATTCTGTTCTGGTGGAGCCGAAACCGGAGC  
ACATAGTCAGGTCCAGCTGCAGCAGTCAGGAGCCGACTGGTGC~~GGCCGGCGCAA~~  
GTGTCAA~~ACTGTCATGCAAGGCCAGCGGGTACCTTCACAGACTACGAGATGCACT~~  
GGGTGAAACAGACCCCTGTGCACGGCCTGAAGTGGATCGCGCTCTGGACCCAAAA  
ACCGGGGATACAGCATATTCCCAGAAGTTAAAGGAAAGGCCACTCTGACCGCTGA  
CAAGAGCTCCTCTACTGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGACATCCGAAGATAGCG  
CCGTGTACTATTGCACCCGTTCTACTCCTACATACATACTGGGGCCAGGGACTCTGG  
TGACCGTCTCTGCAGGAGGAGGAGGCTCTGGAGGAGGAGTGGAGGCGGGGG  
AAGCGACGTGGTCATGACACAGACTCCACTGTCCCTGCCGTGAGCCTGGCGATC  
AGGCTAGCATTCTGTGAAAGTTCACAGAGTCTGGTGCACTCAAACGGAAATACCT  
ATCTGCATTGGTACCTGCAGAACGCCAGGCCAGTCTCCAAACTGCTGATCTATAAGG  
TGAGCAACCGGTTCTCCGGGTCCTGACAGATTCTGGAAGTGGCTCAGGGACAG  
ATTTCACTCTGAAAATTAGCAGAGTGGAGGCCGAAGATCTGGCGTCACTTTGTA  
GCCAGAATACCCACGTCCCACCAACATTGGAAGCGGCACTAAACTGGAAATCAAG  
(SEQ ID NO:2)

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

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCAGGAGCCAACTGGTGCAGGCCGGCGCAA  
 GTGTCAAACGTGATGCAAGGCCAGCGGGTATACCTTACAGACTACGAGATGCACT  
 GGGTGAACAGACCCCTGTGCACGGCCTGAAGTGGATCGCGCTCTGGACCCAAA  
 ACCGGGGATACAGCATATTCCCAGAAGTTAAAGGAAAGGCCACTCTGACCGCTGA  
 CAAGAGCTCCTCTACTGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGACATCCGAAGATAGCG  
 CCGTGTACTATTGCACCCGTTCTACTCCTATACATACTGGGCCAGGGACTCTGG  
 TGACCGTCTCTGCAGGAGGAGGAGGCTCTGGAGGAGGAGGAGTGGAGGCAGGGGG  
 AAGCGACGTGGTCATGACACAGACTCCACTGTCCCTGCCGTGAGCCTGGCGATC  
 AGGCTAGCATTCCTGCGAAGTTACAGACTCCAGTCTGGTGACTCAAACGGAAATACCT  
 ATCTGCATTGGTACCTGCAGAACAGCCAGGAGGACTCTCCAAACTGCTGATCTATAAGG  
 TGAGCAACCGGTTCTCCGGGTCCTGACAGATTCTGGAAGTGGCTCAGGGACAG  
 ATTCACTCTGAAAATTAGCAGAGTGGAGGCCGAAGATCTGGCGTACTTTGTA  
 GCCAGAATACCCACGTCCCACCAACATTGGAAGCGGCACTAAACTGGAATCAAG  
 (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  
 DSAVYYCTRFYSYTYWGQTLTVSAGGGGSGGGGGSDVVMQTPLSLPVSLG  
 DQASISCRSSQLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGV  
 PDRFSGSGSGTDF  
 TLKISRVEAEDLGVYFCSQNTHVPPTFGSGTKLEIKEPKSCDKTHTCPPCPDPKFWVLVV  
 VGGVLACYSLLTVAFIIRVKFRSADAPAYQOQONOLYNELNLGRREEYDVLDKRRGKGHDGLYYQGLSTAT  
RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYYQGLSTAT  
KDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:3)

10 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 FWVLVVVGVLACYSLLTVAFII (SEQ ID NO:5).

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

QVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTDYEMHWVKQTPVHGLKWIGA  
 LDPKTGDTAYSQKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTRFYSYTYWGQG  
 TLTVSAGGGGSGGGGGSDVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQLVHSNGNTY  
 LHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGV  
 PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQNT  
 HVPPTFGSGTKLEIKEPKSCDKTHTCPPCPDPKFWVLVVVGVLACYSLLTVAFIIRVK  
RSADAPAYQOQONOLYNELNLGRREEYDVLDKRRGKGHDGLYYQGLSTAT  
ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ

15 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):

ATGGATTGGATTGGCGCATTCTGTTCTGGTGGAGCCGCAACCGGAGC  
ACATAGTCAGGTCCAGCTGCAGCAGTCAGGAGCCGACTGGTGGGCCGGCGCAA  
 GTGTCAAACTGTCATGCAAGGCCAGCGGGTACCTTCACAGACTACGAGATGCACT  
 GGGTGAAAACAGACCCCTGTGCACGGCCTGAAGTGGATCGGCGTCTGGACCCAAAA  
 ACCGGGGATACAGCATATTCCCAGAAGTTAAAGGAAAGGCCACTCTGACCGCTGA  
 CAAGAGCTCCTCTACTGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGACATCCGAAGAATAGCG  
 CCGTGTACTATTGCACCCGCTTACTCCTATACAACTGGGGCCAGGGACTCTGG  
 TGACCGTCTGCAGGAGGAGGAGGCTCTGGAGGAGGAGGAGTGGAGGCGGGG  
 AAGCGACGTGGTCATGACACAGACTCCACTGTCCTGCCGTGAGCCTGGCGATC  
 AGGCTAGCATTCCCTGTCGAAGTTCACAGAGTCTGGTGCACCAAACGGAAATACCT  
 ATCTGCATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCCAAACTGCTGATCTATAAGG  
 TGAGCAACCCGGTTCTCCGGGTCCTGACAGATTCTGGAAGTGGCTCAGGGACAG  
 ATTCACTCTGAAAATTAGCAGAGTGGAGGCCAAGATCTGGCGTACTTTGTA  
 GCCAGAATACCCACGTCCCACCAACATCGGAAGCGGCACTAAACTGGAAATCAAG  
 GAGCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCACCGTGCCGGATCCGAAAGA  
 TCCCAAATTGGGTGCTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTA  
 GTAACAGTGGCCTTATTATTAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCGC  
GTACCAGCAGGGCCAGAACCAACAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGG  
AGTACGATTTGGACAAGAGACGTGGCCGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCG  
AGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCCGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGG  
CGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCCAGCGCCGGAGGGCAAGGGCA  
CGATGGCCTTACCAAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCC  
CTCA  
CATGCAGGCCCTGCCCTCGC (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 GAGCCAAATCTTGACAAACTCACACATGCCACCGTGCCCGGATCCGAA (SEQ ID NO:7); la región conectora es GATCCCAAA (SEQ ID NO:8); y el dominio transmembranario CD28 es

TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACA  
 GTGGCCTTATTATT (SEQ ID NO:9).

10

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

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCAGGAGCCGAACCTGGTGC GGCCGGCGCAA  
 GTGTCAAACGTGTCATGCAAGGCCAGCGGGTACCTCACAGACTACGAGATGCACT  
 GGGTGAACAGACCCCTGTGCACGGCCTGAAGTGGATCGGCCTCTGGACCCAAAA  
 ACCGGGGATACAGCATATTCCCAGAAGTTAAAGGAAAGGCCACTCTGACCGCTGA  
 CAAGAGCTCCTCTACTGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGACATCCGAAGATAGCG  
 CCGTGTACTATTGCACCCGCTTCACTCCTACATACATACTGGGGCCAGGGGACTCTGG  
 TGACCGTCTCTGCAGGAGGAGGAGGCTCTGGAGGAGGAGGAGTGGAGGCAGGGGG  
 AAGCGACGTGGTCATGACACAGACTCCACTGTCCCTGCCGTGAGCCTGGCGATC  
 AGGCTAGCATTCCCTGTCGAAGTTCACAGAGTCTGGTGCACCAAACGGAAATACCT  
 ATCTGCATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAACTGCTGATCTATAAGG  
 TGAGCAACCGGTTCTCCGGGTCCTGACAGATTTCTGGAAGTGGCTCAGGGACAG  
 ATTTCACTCTGAAAATTAGCAGAGTGGAGGCCAGATCTGGCGTCTACTTTGTA  
 GCCAGAATACCCACGTCCCACCAACATTGGAAGCGGCACTAAACTGGAAATCAAG  
 GAGCCAAATCTTGTGACAAACTCACACATGCCACCCTGCCGGATCCGAAAGA  
 TCCCAAATTGGGTGCTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTA  
 GTAACAGTGGCCTTATTATTAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCGC  
GTACCAGCAGGCCAGAACCAACATCGGAAGCGGCACTAAACTGGAAATCAAG  
AGTACGATGTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCCTGAGATGGGGGGAAAGCCG  
AGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCGTACAATGAACACTGCAGAAAGATAAGATGG  
CGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCA  
CGATGGCCTTACCAGGGTCTCAGTACAGCACCACGACACCTACGACGCCCTCA  
CATGCAGGCCCTGCCCTCGC (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 es el líder):

5

MDWIWRILFLVGAATGAHSQVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTDY  
 EMHWVKQTPVHGLKWIGALDPKTGDTAYSQKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSE  
 DSAVYYCTRFYSYTYWGQTLVTVSAGGGGGGGGGSDVVMTQTPLSLPVSLG  
 DQASISCRSSQLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDF  
 TLKISRVEAEDLGVYFCSQNTHPPTFGSGTKLEIKEPKSCDKTHTCPPCPDPKFWVLVV  
 VGGVLACYSLLTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAA  
 YRSRVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP  
QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP  
R (SEQ ID NO:10)

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

FWVLVVVGGVLACYSLVTVAIFIWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYA  
PPRDFAAYRS (SEQ ID NO:11).

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

5

QVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTDYEMHWVKQTPVHGLKWIGA  
LDPKTGDTAYSQKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTRFYSYTYWGQG  
TLTVVSAGGGGGGGGGGGSDVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTY  
LHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQNT  
HVPPTFGSGTKLEIKEPKSCDKTHTCPCPDPKFVVLVVVGGVLACYSLVTVAIFIWV  
RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQQO  
NQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI  
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

ATGGATTGGATTGGCGCATTCTGTTCTGGTGGGAGCCGCAACCGGAGC  
ACATAGTCAGGTCCAGCTGCAGCAGTCAGGAGCCGACTGGTGCGGCCCGCGCAA  
GTGTCAAACTGTCATGCAAGGCCAGCGGGTACACCTTCACAGACTACGAGATGCACT  
GGGTGAAACAGACCCCTGTGCACGGCCTGAAGTGGATCGGCCTCTGGACCCAAA  
ACCGGGGATACAGCATATTCCAGAAGTTAAAGGAAAGGCCACTCTGACCGCTGA  
CAAGAGCTCCTCTACTGCCCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGACATCCGAAGATAGCG  
CCGTGTACTATTGCACCCGCTCTACTCCTATACATACTGGGGCCAGGGACTCTGG  
TGACCGTCTCTGCAGGAGGAGGAGGCTCTGGAGGAGGAGGAGTGGAGGCGGGGG  
AAGCGACGTGGTCATGACACAGACTCCACTGTCCCTGCCCGTGAGCCTGGCGGATC  
AGGCTAGCATTCCCTGCGAAGTTCACAGAGTCTGGTGCACTCAAACGGAAATACCT  
ATCTGCATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCCAAACTGCTGATCTAAGG

TGAGCAACCGGTTCTCCGGGGTCCCTGACAGATTTCTGGAAGTGGCTCAGGGACAG  
 ATTTCACTCTGAAAATTAGCAGAGTGGAGGCCGAAGATCTGGCGTCTACTTTGTA  
 GCCAGAATACCCACGTCCCACCAACATTGGAAGCGGCACTAAACTGAAATCAAG  
 GAGCCAAATCTGTGACAAAACCTCACACATGCCAACCGTGCCCAGATCCGAAAGA  
 TCCCAAATTTGGGTGCTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTA  
 GTAACAGTGGCCTTATTATTTCTGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCAC  
 AGTGAATACATGAACATGACTCCCCGCCCGCCACCCGCAAGCATTACCA  
 GCCCTATGCCCAACCACCGCACTTCGAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTAGCAG  
GAGCGCAGACGCCCGTACAGCAGGCCAGAACCAAGCTCTATAACGAGCTCA  
ATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATTTGGACAAGAGACGTGGCCGGACCC  
GAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCCGTACAATGAAC  
TGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGATGAAAGGCGAGCG  
CCGGAGGGCAAGGGCAGATGGCCTTACCAAGGTCTCAGTACAGCCACCAAGG  
ACACCTACGACGCCCTCACATGCAGGCCCTGCCCTCGC (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

TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACA  
 GTGGCCTTATTATTTCTGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGAC  
 TACATGAACATGACTCCCCGCCCGCCACCCGCAAGCATTACCAAGCCCTAT  
 GCCCCACCACCGCACTTCGAGCCTATCGCTCC (SEQ ID NO:13).

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

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCAGGAGCCGAACGGTGCAGGCCGGCGCAA  
 GTGTCAAACGTGATGCAAGGCCAGCGGGTACACCTCACAGACTACGAGATGCACT  
 GGGTGAACAGACCCCTGTGCACGCCCTGAAGTGGATCGCGCTCTGGACCCAAA  
 ACCGGGGATACAGCATATTCCCAGAAGTTAAAGGAAAGGCCACTCTGACCGCTGA  
 CAAGAGCTCCTACTGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGACATCGAAGATAGCG  
 CCGTGTACTATTGCACCCGCTTCTACTCCTACATACACTGGGGCCAGGGACTCTGG  
 TGACCGTCTGCAGGAGGAGGAGGCTCTGGAGGAGGAGGAGTGGAGGCGGGGG  
 AAGCGACGTGGTACGACACAGACTCCACTGTCCCTGCCGTGAGCCTGGCGATC

10

AGGCTAGCATTCTGCGAAGTTCACAGAGTCTGGTGCACCAAACGGAAATACCT  
 ATCTGCATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCCAAACGTGATCTATAAGG  
 TGAGCAACCAGGTTCTCCGGGCTCCCTGACAGATTTCTGGAAGTGGCTCAGGGACAG  
 ATTTCACTCTGAAAATTAGCAGAGTGGAGGCCAAGATCTGGCGTCACTTTGTA  
 GCCAGAATACCCACGTCCCACCAACATTGGAAGCGGCACAACTGGAAATCAAG  
 GAGCCAAATCTGTGACAAAACACATGCCACCGTGCCTGGATCCGAAAGA  
 TCCCAAATTTGGGTGCTGGTGGTGGAGTCCTGGCTGCTATAGCTTGCTA  
 GTAACAGTGGCCTTATTATTTCTGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCAC  
 AGTGAATGACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCCGGGCCACCGCAAGCATTACCA  
 GCCCTATGCCACCACCGCGACTTCGAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAG  
GAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCGCAGGGCCAGAACCAAGCTCTATAACGAGCTCA  
ATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCT  
GAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAAC  
TGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCG  
CCGGAGGGCAAGGGCACGATGGCCTTACCAGGGCTCAGTACAGCCACCAAGG  
ACACCTACGACGCCCTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO:29)

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

MDWIWRILFLVGAATGAHSQVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTDY  
 EMHWVKQTPVHGLKWIGALDPKTGDTAYSQKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSE  
 DSAVYYCTRFYSYTYWGQGTLVTVSAGGGSGGGSGGGSDVVMQTPLSLPVSLG  
 DQASISCRSSQLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGTDF  
 TLKISRVEAEDLGVYFCSQNTHVPPFGSGTKLEIKEPKSCDKHTCPCPDPKFWVLVV  
 VGGVLACYSLLVTVAFIIKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL  
RVKFRSADAPAYQQQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG  
LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR  
 (SEQ ID NO:14)

10 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 endodomnio 41BB es KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO:15).

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

QVQLQQSGAELVRPGASVKSCKASGYTFTDYEMHWVKQTPVHGLWIGA  
 LDPKTGDTAYSQKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSA VYYCTRFYSYTYWGQG  
 TLTVSAGGGGGGGGGGGGGSDVVMQTPLSLPVLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTY  
 LHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQNT  
 HVPPTFGSGTKLEIKEPKSCDKTHCPCDPKFWLVVVGGVLACYSLLVTVAIFIKRG  
RKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQL  
YNELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELOQDKMAEAYSEIGMK  
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

ATGGATTGGATTGGCGCATTCTGTTCTGGTGGAGCCGCAACCGGAGC  
ACATAGTCAGGTCCAGCTGCAGCAGTCAGGAGCCAACTGGTGCGGCCGGCGCAA  
 GTGTCAAACGTGTCATGCAAGGCCAGCGGGTACCTTCACAGACTACGAGATGCACT  
 GGGTGAAACAGACCCCTGTGCACGGCCTGAAGTGGATCGCGCTCTGGACCCAAA  
 ACCGGGGATACAGCATATTCCCAGAAGTTAAAGGAAAGGCCACTCTGACCGCTGA  
 CAAGAGCTCCTCTACTGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGACATCCGAAGATAGCG  
 CCGTGTACTATTGCACCCGCTTACTCCTATACATACTGGGGCCAGGGACTCTGG  
 TGACCGTCTGCAGGAGGAGGCTGGAGGAGGAGGGAGTGGAGGCGGGGG  
 AAGCGACGTGGTCATGACACAGACTCCACTGTCCCTGCCGTGAGCCTGGCGATC  
 AGGCTAGCATTCCCTGTCGAAGTTCACAGAGTCTGGTGCACACTAAACGGAAATACCT  
 ATCTGCATTGGTACCTGCAAGGCCAGCTCCAAACTGCTGATCTATAAGG  
 TGAGCAACCGGTTCTCCGGGTCCCTGACAGATTCTGGAAGTGGCTCAGGGACAG  
 ATTCACTCTGAAAATTAGCAGAGTGGAGGCCAGATCTGGCGTACTTTGTA  
 GCCAGAATACCCACGTCCCACCAACATTGGAAGCGGCACAAACTGGAAATCAAG  
 GAGCCAAATCTTGTGACAAAACACACATGCCACCCTGCCCCGATCCGAAAGA  
 TCCCAAATTTGGGTGCTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTGCTA  
 GTAACAGTGGCCTTATTATTAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAA  
  
 CAACCATTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCG  
 ATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGC  
GCAGACGCCCGCGTACCAGCAGCAGGCCAGAACAGCTCTATAACGAGCTCAATCT  
AGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCTGAG  
ATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCCGTACAATGAACTG  
AGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGATGAAAGGCGAGCGCCG  
GAGGGGCAAGGGCAGATGGCCTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACA  
CCTACGACGCCCTCACATGCAGGCCCTGCCGCTGCCCCCTCGC (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

AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTATGAGACCAGT  
 ACAAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTCCAGAAGAAGAAGAAG  
 GAGGATGTGAAC TG (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:

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCAGGAGCCGA CTGGTGCGGCCGGCGCAA  
 GTGTCAA ACTGTCATGCAAGGCCAGCGGGTATACCTTACAGACTACGAGATGCACT  
 GGGTGA AAACAGACCCCTGTGCACGGCCTGAAGTGGATCGGCCTCTGGACCCAAAA  
 ACCGGGGATACAGCATATTCCCAGAAGTTAAAGGAAAGGCCACTCTGACCGCTGA  
 CAAGAGCTCCTCTACTGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGACATCCGAAGATAGCG  
 CCGTGTACTATTGCACCCGCTTACTCCTATACATACTGGGGCCAGGGACTCTGG  
 TGACCGTCTCTGCAGGAGGAGGAGGCTCTGGAGGAGGAGGAGTGGAGGC GGGG  
 AAGCGACGTGGTCATGACACAGACTCCACTGTCCCTGCCGTGAGCCTGGCGATC  
 AGGCTAGCATTCCCTGTCGAAGTTCACAGAGTCTGGTGCACTCAAACGGAAATACCT  
 ATCTGCATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCCAA ACTGCTGATCTAAGG  
 TGAGCAACC GGTTCTCGGGGTCCCTGACAGATTTCTGGAAGTGGCTCAGGGACAG  
 ATTTCACTCTGAAAATTAGCAGAGTGGAGGCCGAAGATCTGGCGTCACTTTGTA  
 GCCAGAATACCCACGTCCCACCAACATTGGAAGCGGCACTAAACTGGAAATCAAG  
 GAGCCCAAATCTGTGACAAA ACTCACACATGCCACCGTGCCGGATCCGAAAGA  
 TCCCAAATTGGGTGCTGGTGGTTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTA  
 GTAACAGTGGCCTTATTATTAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAA  
 CAACCATTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCG  
 ATTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGA ACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGC  
GCAGACGCCCCCGTACCAGCAGGCCAGAACCCAGCTCTATAACGAGCTCAATCT  
AGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTGACAAGAGACGTGGCCGGACCC CTGAG  
ATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCC GTACAATGAACTGC  
AGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGATGAAAGGCAGCGCCG  
GAGGGGCAAGGGGCACGATGCCCTTACCAAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACA  
CCTACGACGCCCTCACATGCAGGCC CTGCCCG (SEQ ID NO:31)

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

MDWIWRILFLVGAATGAHSQVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTDY  
EMHWVKQTPVHGLKWIGALDPKTGDTAYSQKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSE  
DSAVYYCTRFYSYTYWGQGTLVTVSAGGGGGGGGGGGSDVVMQTPLSLPVSLG  
DQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRSGVPDRFSGSGTDF  
TLKISRVEAEDLGVYFCSQNTHVPPFGSGTKLEIKEPKSCDKTHTCPCPDPKFWVLVV  
VGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAA  
YRSKGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQ  
QGONQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELOQDKMAEA  
YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:18)

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 endodomino es SEQ ID NO:11; los aminoácidos conectores son DPK; y el endodomino 41BB es SEQ ID NO:15.

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

QVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTDYEMHWVKQTPVHGLKWIGA  
LDPKTGDTAYSQKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTRFYSYTYWGQG  
TLVTVSAGGGGGGGGGGGSDVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTY  
LHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQNT  
HVPPFGSGTKLEIKEPKSCDKTHTCPCPDPKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV  
RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYYRSKGRKKLLYIFKQPFMRP  
VQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQQGQONQLYNELNLGRREEYDV  
LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELOQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLY  
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:

ATGGATTGGATTGGCGCATTCTGTTCTGGTGGAGCCGCAACCGGAGC  
ACATAGTCAGGTCCAGCTGCAGCAGTCAGGAGCCGACTGGTGCGGCCGGCGCAA  
GTGTCAAACTGTCATGCAAGGCCAGCGGGTTACCTTACAGACTACGAGATGCACT  
GGGTGAAACAGACCCCTGTGCACGGCCTGAAGTGGATCGGCGCTCTGGACCCAAA  
ACCGGGGATACAGCATATTCCCAGAAGTTAAAGGAAAGGCCACTCTGACCGCTGA  
CAAGAGCTCCTCTACTGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGACATCCGAAGATAGCG  
CCGTGTACTATTGCACCCGCTTACTCCTATACATACTGGGGCCAGGGACTCTGG  
TGACCGTCTGCAGGAGGAGGAGGCTTGAGGAGGAGGAGTGGAGGCGGGG  
AAGCGACGTGGTCATGACACAGACTCCACTGTCCCTGCCGTGAGCCTGGCGATC  
AGGCTAGCATTCCCTGTCGAAGTTACAGACTGCTGGTGCACTCAAACGGAAATACCT  
ATCTGCATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAACTGCTGATCTATAAGG  
TGAGCAACCGGTTCTCCGGGCTCCGACAGATTCTGGAAGTGGCTAGGGACAG  
ATTCACTCTGAAAATTAGCAGAGTGGAGGCCGAAGATCTGGCGTCTACTTTGTA  
GCCAGAATACCCACGTCCCACCAACATTGGAAGCGGACTAAACTGGAAATCAAG  
GAGCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCACCGTGCCCGATCCGAAAGA  
TCCCAAATTGGGGTGCTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTGCTA  
GTAACAGTGGCCTTATTATTCTGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCAC  
AGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCCGGCCACCCGCAAGCATTACCA  
GCCCTATGCCCCACCACCGCGACTTCGAGCCTATCGCTCCAAACGGGGCAGAAAGA  
AACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGG  
AAGATGGCTGTAGCTGCCGATTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGAGTGTGAACTGAGA  
GTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCT  
CTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTGGACAAGAGAC  
GTGGCCGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCCTCAGGAAGG  
CCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGA  
TGAAAGGCAGCGCCGGAGGGCAAGGGCACGATGGCCTTACCAGGGTCTCAGT  
ACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCTCGC  
(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 endodomino es SEQ ID NO:13; y el endodomino 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:

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCAGGAGCCGAACGGTGCAGGCCGGCGCAA  
GTGTCAAACGTGCAAGGCCAGCGGGTACCTCACAGACTACGAGATGCACT  
GGGTGAAACAGACCCCTGTGCACGGCCTGAAGTGGATCGCGCTCTGGACCCAAA  
ACCGGGGATACAGCATATTCCCAGAAGTTAAAGGAAAGGCCACTCTGACCGCTGA  
CAAGAGCTCCTCTACTGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGACATCCGAAGATAGCG  
CCGTGTACTATTGCACCCGCTTCTACTCCTATACATACTGGGCCAGGGACTCTGG  
TGACCGTCTCTGCAGGAGGAGGAGGCTCTGGAGGAGGAGGGAGTGGAGGCGGGGG  
AAGCGACGTGGTCATGACACAGACTCCACTGTCCCTGCCGTGAGCCTGGGCGATC  
AGGCTAGCATTCTGTCGAAGTTCACAGAGTCTGGTGCCTCAAACGGAAATACCT  
ATCTGCATTGGTACCTGCAGAACAGCCAGGAGTCTCCAAACTGCTGATCTATAAGG  
TGAGCAACCAGGTTCTCCGGGTCCTGACAGATTCTGGAAGTGGCTCAGGGACAG  
ATTTCACTCTGAAAATTAGCAGAGTGGAGGCCAGATCTGGCGTACTTTGTA  
GCCAGAATACCCACGTCCCACCAACATTGGAAGCGGACTAAACTGAAATCAAG  
GAGCCAAATCTGTGACAAAACACACATGCCAACCGTGCCCGATCCGAAAGA  
TCCCAAATTTGGGTGCTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTA  
GTAACAGTGGCTTTATTATTTCTGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCTGCAC  
AGTGAATGAACTGACTCCCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCA  
GCCCTATGCCAACCGCGACTCGCAGCCTATCGCTCAAACGGGCAGAAAGA  
AACTCCTGTATATATTCAAACACCATTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGG  
AAGATGGCTGTAGCTGCCGATTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGA  
GTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGTACCGAGCAGGCCAGAACCGACT  
CTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTGGACAAGAGAC  
GTGGCCGGACCCTGAGATGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGG  
CCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGA  
TGAAAGGCAGCGCCGGAGGGCAAGGGCACGATGGCCTTACCGGGTCTCAGT  
ACAGGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTCACATGCAGGCCCTGCCCTCGC  
(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:

V<sub>H</sub>

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCAGGAGCCGAACCTGGTGCAGGCCGGCGCAA  
 GTGTCAAACACTGTATGCAAGGCCAGCAGGGTACACCTCACAGACTACGAGATGCACT  
 GGGTGAACAGACCCCTGTGCACGGCCTGAAGTGGATCGCGCTCTGGACCCAAAA  
 ACCGGGGATACAGCATATTCCCAGAAGTTAAAGGAAAGGCCACTCTGACCGCTGA  
 CAAGAGCTCCTCTACTGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGACATCCGAAGATAGCG  
 CCGTGTACTATTGCACCCGCTCTACTCCTACATACATACTGGGCCAGGGACTCTGG  
 TGACCGTCTCTGC (SEQ ID NO:20)

V<sub>L</sub>

GACGTGGTCATGACACAGACTCCACTGTCCCTGCCGTGAGCCTGGCGA  
 TCAGGCTAGCATTCTGTGAAGTTACAGAGTCTGGTGCACCAAACGGAAATAC  
 CTATCTGCATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAACTGCTGATCTATAA  
 GGTGAGCAACCGGTTCTCCGGGTCCCTGACAGATTCTGGAAGTGGCTCAGGGAC  
 AGATTCACTCTGAAATTAGCAGAGTGGAGGCCGAAGATCTGGCGTCACTTTG  
 TAGCCAGAATAACCCACGTCCCACCAACATTGGAAGCGGCACTAAACTGGAAATCA  
 A (SEQ ID NO:21)

#### Secuencias de aminoácidos

V<sub>H</sub>

QVQLQQSGAELVRPGASVKSCKASGYTFTDYEMHWVKQTPVHGLKWIGA  
 LDPKTGDTAYSQKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTRFYSYTYWGQQ  
 TLTVVSA (SEQ ID NO:22)

V<sub>L</sub>

DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLL  
 IYKVSNRFSGVPDFRSGSGSTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQNTHPPTFGSGTKLEIK  
 (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.

#### II. Células

15 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

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

- 5 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 heterólogico codificado por un vector. Una célula hospedadora puede usarse, y se ha usado, como destinataria de vectores. Una célula hospedadora puede 10 "transfектarse" 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 15 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.
- 20 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 cotransfектando 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. 25
- 25 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, 30 así como la producción de los ácidos nucleicos codificados por vectores y sus polipéptidos, proteínas o péptidos análogos.
- 35 Las células pueden ser células autólogas, células singénicas, células alogénicas e incluso, en algunos casos, células xenogénicas.
- 35 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 40 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 45 de dimerización (CID), por ejemplo. Pueden utilizarse sistemas suicidas basados en timidina cinasa.

### III. Ejemplificaciones ilustrativas

- 50 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 períodos 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 55 reconocimiento inmunitario y se colocan en el sitio del tumor.
- 60 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 65 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
- 5 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
- 10 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
- 15 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.
- 20 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
- 25 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

- 30 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.
- 35 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
- 40 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.
- 45 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.
- 50 Las células pueden administrarse según se deseé. 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.
- 55 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

5

### 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, 10 Maniatis *et al.*, 1988 y Ausubel *et al.*, 1994).

15

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 20 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 25 de expresión pueden contener secuencias de ácido nucleico que también cumplen otras funciones, y se describen a continuación.

25

### 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 30 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 35 funcionales correctas en relación con una secuencia de ácido nucleico para controlar el inicio y/o la expresión transcripcional de esa secuencia.

35

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 40 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 45 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.

45

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 50 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 en *cis* que participa en la activación transcripcional de una secuencia de ácido nucleico.

55

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

60 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

65

- recombinante incluyen los sistemas promotores de beta-lactamasa (penicilinasa), 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.
- 5 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.
- 10 Adicionalmente, también podría usarse cualquier combinación de promotor/potenciador para dirigir la expresión. El posible el 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.
- 15 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.
- 20 25 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.
- 30 35 40 45 50 55 60 65 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 hipoxico. En algunos aspectos descritos en el presente documento, los factores son citocinas y/o quimiocinas. Por ejemplo, la hipoxia induce la expresión de HIF-1α, 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 liguen 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 bícatenario, 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 retrovírico, 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 retrovírica 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 transcripto 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 retrovíricos 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 retrovíricos 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 potan 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 30 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 40 característicos para diversas células de mamífero (Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Coupar *et al.*, 1988; Horwitz *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 retrovíricos, 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 50 específica de hepatocitos mediante receptores de sialoglucoproteína.

Se diseñó otra estrategia para dirigir retrovirus recombinantes en que se usaron anticuerpos biotinilados contra una proteína de la envoltura retrovírica 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 55 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 transplantados pueden colocarse en un organismo. En determinados aspectos, un ácido nucleico se expresa en las células transplantadas.

5

## VII. Kits de la divulgación

10 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.

15 15 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 20 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.

25 25 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.

30 30 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.

35 35 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 40 un CAR como se describe en la presente divulgación y/o elementos reguladores para los mismos.

45 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.

50 50 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.

## 55 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 55 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.

60 60 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 proporcionarán 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

5 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 retrovírico, indujo satisfactoriamente la susceptibilidad al agente antivírico 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.

10 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, habrá que asegurarse, en general, de que no pasará 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.

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

20 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/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

25 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.

### 30 **A. Quimioterapia**

35 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, procarbazina, mecloretamina, ciclofosfamida, campotecina, ifosfamida, melfalán, clorambucilo, busulfano, nitrosurea, dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, bleomicina, plicomicina, mitomicina, etopósido (VP16), tamoxifeno, raloxifeno, agentes de unión a receptor de estrógeno, taxol, gemcitabien, 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.

40 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.

### 45 **B. Radioterapia**

50 Otros factores que causan daño en el ADN y se han usado ampliamente incluyen lo que comúnmente se conocen como rayos  $\gamma$ , 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 períodos 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.

55 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.

### 60 **C. Inmunoterapia**

65 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 efecto 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 efecto 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 efecto 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.

- 5 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.
- 10

15 **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 20 proliferación celular, inhibidores de proliferación celular, o reguladores de muerte celular programada.

**E. Cirugía**

25 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, inmunoterapia, y/o terapias alternativas.

30 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.

35 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.

40 **F. Otros agentes**

45 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 50 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 55 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.

60 **Ejemplo 1**

**CAR específicos de GPC3**

65 Como se describe en el presente documento, hay CAR específicos de glipcano-3 (CAR GPC3) con distinta combinación de endodomínios 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 glipícano-3 por transducción retrovírica, y reconocen células tumorales que expresan glipícano-3.

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

10 **Expresión de superficie celular de CAR GPC3:** Se estimularon linfocitos T con OKT3 y anti-CD28 seguido de transducción retrovírica. 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.

15 **Los linfocitos T CAR GPC3 reconocen y destruyen dianas GPC3<sup>pos</sup>:** Se cargaron líneas celulares GPC3<sup>pos</sup> (HepG2, HUH7 y Hep3B), así como GPC3<sup>neg</sup> (A549) con Cr<sup>51</sup> y se incubaron con linfocitos T CAR GPC3 en un ensayo convencional de liberación de Cr<sup>51</sup> de 4 h. Se detectó destrucción eficaz en las 3 dianas GPC3<sup>pos</sup>, dependiente de la relación de efecto a diana, mientras que la diana GPC3<sup>neg</sup> no se destruyó.

20 **Los linfocitos T CAR GPC3 liberan IFN-γ tras estimulación con dianas GPC3<sup>pos</sup>:** Se cocultivaron linfocitos T CAR GPC3 durante 24 h con líneas celulares GPC3<sup>pos</sup> (HepG2, HUH7 y Hep3B), así como GPC3<sup>neg</sup> (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<sup>pos</sup>, 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<sup>neg</sup>, excepto para GBBz que inducía liberación espontánea de bajo nivel de IFN-γ.

25 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.

30 **Ejemplo 2**

35 **CAR de glipícano-3**

40 El glipícano-3 (GPC3) es uno de los seis miembros de mamífero de la familia de proteoglucanos de glipícano. El glipícano-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 señaliza 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 rhabdoides, 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).

45 **Expresión de glipícano-3 en líneas celulares tumorales.** HepG2 (HB), HUH7 (HCC) y Hep3B (HCC positiva al virus de la hepatitis B), G401 (tumor rhabdoide maligno) y A549 (cáncer pulmonar) se evaluaron para la expresión de GPC3 por análisis FACS usando el anticuerpo YP7 específico de glipícano-3. HepG2 (HB), HUH7 (HCC) y Hep3B (HCC positiva al virus de la hepatitis B), G401 (tumor rhabdoide 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 químicos de antígeno específicos de GPC3 (CAR GPC3) novedosos.

50 **Estructura y expresión de superficie celular de CAR GPC3.** El fragmento variable monocatenario del MAb GC33 específico antiglipícano-3 se clonó en el marco de lectura en vectores retrovíricos 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 transdijeron con vectores retrovíricos que codificaban las construcciones indicadas. Se midió la expresión de superficie celular de los CAR por citometría de flujo usando IgG de cabra antífragmento 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).

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

5 GPC3 indicadas en la estufa de incubación convencional de cultivo celular de 37C. 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<sup>pos</sup> a todas las relaciones de efector a diana ensayadas. La línea celular A549 GPC3<sup>neg</sup> no se destruyó por ninguno de los linfocitos T CAR GPC3, lo que confirma la especificidad (FIG. 8).

10 5 **Los linfocitos T CAR GPC3 secretan citocinas en presencia de células GPC3<sup>pos</sup>.** 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,

15 10 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<sup>pos</sup> (FIG. 10). GBBz produjo menos IL-2 (FIG. 10A-10E) e IL-10 (FIG. 10F-10J). Aunque no se detectó IFN $\gamma$  cuando los linfocitos T que expresan Gz, G28z o G28BBz se cocultivaban con la línea celular A549 GPC3<sup>neg</sup>, se detectó producción espontánea de citocinas por linfocitos T que expresan CAR GBBz (FIG. 10K-10O).

20 15 **Los linfocitos T CAR GPC3 proliferan tras encontrar células GPC3<sup>pos</sup>.** 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

25 20 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).

30 25 **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 $\gamma$ <sup>nulo</sup> se les inyectó la línea celular HCC HUH7 GPC3<sup>pos</sup> por vía intraperitoneal seguida 14 días después de la inyección intravenosa (iv) de  $1 \times 10^7$  linfocitos T CAR GPC3 que también se transdijeron con un vector retrovírico que codifica un gen de fusión de luciérnaga GFP (GFP.ffLuc) para permitir la toma de imágenes de bioluminiscencia en serie. Linfocitos T CAR GD2 y los linfocitos

35 30 T que se transdijeron 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 endodominiós coestimulantes que contienen 41BB habían demostrado expansión superior en comparación con linfocitos T CAR Gz o G28z (FIG. 11A, B).

40 35 **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 $\gamma$ <sup>nulo</sup> se les inyectó la línea celular HCC HUH7 GPC3<sup>pos</sup>, 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  $1 \times 10^7$  linfocitos T CAR GPC3 (FIG. 12).

45 40 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 ( $1 \times 10^6$  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).

50 45 **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 $\gamma$ <sup>nulo</sup> se les inyectó la línea celular de tumor rabdoide maligno G401 GPC3<sup>pos</sup>, 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  $2 \times 10^7$  linfocitos T CAR GPC3 (FIG. 12). Los linfocitos T CAR GPC3 produjeron un efecto antitumoral

55 50 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).

60 55 **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 retrovírica (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

5 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.

10 Ejemplo 3

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

15 Los NKT son un subconjunto evolutivamente conservado de linfocitos innatos que se caracterizan por la expresión de un TCR invariable de cadena  $\alpha$  V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 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).

20 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.

25 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 $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18, se activaron con la fracción negativa estimulada con alfa-galactosilceramida (aGalCer) de PBMC irradiados autólogos, se transdijeron en el día 30 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 $\alpha$  invariable (V $\alpha$ 24J $\alpha$ 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.

35 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).
- 40 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
- 45 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
- 50 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
- 55 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
- 60 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
- 65 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).
- 5 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 glycan-3 for advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci.* 2014 Apr;105(4):455-62
- 10 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).
- 15 Levy M, Trivedi A, Zhang J, Miles L, Mattis AN, Kim GE, Lassman C, Anders RA, Misdraji J, Yerian LM, *et al.* Expression of glycan-3 in undifferentiated embryonal sarcoma and mesenchymal hamartoma of the liver. *Hum. Pathol.* 2012 May;43(5):695-701. PMCID:PMC3568522
- 15 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).
- 20 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).
- 25 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).
- 25 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).
- 30 Song, L. *et al.* Valpha24-invariant NKT cells mediate antitumor activity via killing of tumor-associated macrophages. *J. Clin. Invest* 119, 1524-1536 (2009).
- 35 Tretiakova M, Zynger DL, Luan C, Andeen NK, Finn LS, Kocherginsky M, Teh BT, Yang XJ. Glycan 3 overexpression in primary and metastatic Wilms tumors. *Virchows Arch.* 2015 Ene;466(1):67-76
- 35 Wang XY, Degos F, Dubois S, Tessiore S, Allegretta M, Guttmann RD, Jothy S, Belghiti J, Bedossa P, Paradis Vr. Glycan-3 expression in hepatocellular tumors: diagnostic value for preneoplastic lesions and hepatocellular carcinomas. *Human Pathology* 2006 Nov;37(11): 1435-41
- 40 Yamauchi N, Watanabe A, Hishinuma M, Ohashi Ki, Midorikawa Y, Morishita Y, Niki T, Shibahara J, Mori M, Makuuchi M, *et al.* The glycan 3 oncofetal protein is a promising diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. *Mod Pathol* 2005 May 13; 18(12): 1591-8
- 45 Zynger DL, Gupta A, Luan C, Chou PM, Yang GY, Yang XJ. Expression of glycan 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. Glycan 3: a novel marker in testicular germ cell tumors. *Am.J.Surg.Pathol.* 2006 Dic;30(12): 1570-5
- 50 Zynger DL, Everton MJ, Dimov ND, Chou PM, Yang XJ. Expression of glycan 3 in ovarian and extragonadal germ cell tumors. *Am.J.Clin.Pathol* 2008 Ago;130(2):224-30
- 55 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 glycan-3, in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2013 Feb 15;19(4):920-8
- 55 Listado de secuencias
- 60 <110> Heczey, Andras Attila  
Gottschalk, Stephen M.G.  
Metelitsa, Leonid S.  
Dotti, Giampietro
- <120> Receptores químicos de antígeno de glicano-3
- 65 <130> BAYM.P0150WO-11509126

<140> desconocido  
 <141> 25/09/2015

5 <150> 62/055.979  
 <151> 26/09/2014

10 <160> 33

10 <170> PatentIn versión 3.5

10 <210> 1  
 <211> 261  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

15 <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 Ser Gly Gly Gly Ser  
 130 135 140

ES 2 844 700 T3

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 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

5 <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

ES 2 844 700 T3

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 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 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 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 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

ES 2 844 700 T3

Thr Cys Thr Ala Cys Thr Cys Cys Thr Ala Thr Ala Cys Ala Thr Ala  
355 360 365

Cys Thr Gly Gly Gly Cys Cys Ala 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 Cys Thr Cys  
405 410 415

Thr Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Thr  
420 425 430

Gly Gly Ala Gly Gly Cys 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 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 Thr Cys Cys Cys Thr Gly  
625 630 635 640

Ala Cys Ala Gly Ala Thr Thr Thr Cys Thr Gly Gly Ala Ala Gly  
645 650 655

Thr Gly Gly Cys Thr Cys Ala 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 Cys Gly Thr Cys Thr Ala Cys  
705 710 715 720

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 Cys Ala Cys Thr  
755 760 765

Ala Ala Ala Cys Thr Gly Ala Ala Ala Ala Thr Cys Ala Ala Gly  
770 775 780

<210> 3

<211> 415

5 <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 Ser Gly Gly Gly Ser  
 130 135 140

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

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

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

<210> 5

<211> 24

15 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

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

20 Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile  
20

<210> 6

<211> 1254

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

25

ES 2 844 700 T3

<400> 6

atggatttgc 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 gctcctctac tgcctacatg 300  
gagctgagga gcctgacatc cgaagatagc gccgtgtact attgcacccg cttctactcc 360  
tatacatact ggggccaggg gactctggtg accgtctctg caggaggagg aggctctgga 420  
ggaggaggga gtggaggccg gggaaagcgcac gtggcatga cacagactcc actgtccctg 480  
cccgtagcc tggcgatca ggctagcatt tcctgtcgaa gttcacagag tctggtgac 540  
tcaaacggaa atacctatct gcattggta ctcagaagc caggccagtc tcccaaactg 600  
ctgatctata aggtgagcaa ccgggtctcc ggggtccctg acagatttc tggaaagtggc 660  
tcagggacag atttcactct gaaaattagc agagtggagg ccgaagatct gggcgctctac 720  
ttttgtagcc agaataccca cgtccccacca acattcgaa gccccactaa actggaaatc 780  
aaggagccca aatcttgta caaaactcac acatgcccac cgtccccggc tccgaaagat 840  
cccaaatttt gggtgctggt ggtggttgggt ggagtccctgg cttgctatacg cttgctagta 900  
acagtggcct ttattattag agtgaagttc agcaggagcg cagaccccc cgcgtaccag 960  
cagggccaga accagctcta taacgagctc aatctaggac gaagagagga gtacgatgtt 1020  
ttggacaaga gacgtggccg ggaccctgag atggggggaa agccgagaag gaagaaccct 1080  
caggaaggcc tgcataatga actgcagaaa gataagatgg cggaggccctc cagtgagatt 1140  
gggatgaaag gcgagcgccg gagggggcaag gggcacgatg gccttacca gggctcagt 1200  
acagccacca aggacaccta cgacgccccctt cacatgcagg ccctgcccccc tcgc 1254

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

10 <400> 7  
gagcccaaat ctgtgacaa aactcacaca tgcccacccgt gccccgatcc gaaa 54

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

20 <400> 8  
gatcccaaa  
<210> 9  
<211> 72  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

9

## ES 2 844 700 T3

&lt;400&gt; 9

ttttgggtgc	tggtgtgg	tggtgagtc	ctggcttgct	atagcttgct	agtaacagtg	60
gcctttat	ta					72

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

10          &lt;400&gt; 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	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser		
				130			135			140					

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				

ES 2 844 700 T3

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  
210 215 220 240

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 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

5 <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

10 Ala Tyr Arg Ser  
65

<210> 12

<211> 1386

<212> ADN

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 12

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
cagaagttt	aaggaaaggc	cactctgacc	gctgacaaga	gctcctctac	tgccatcatg	300
gagctgagga	gcctgacatc	cgaagatgc	gccgtgtact	attgcacccg	cttctactcc	360
tatacatact	ggggccaggg	gactctggt	accgtctctg	caggaggagg	aggctctgga	420
ggaggaggga	gtggaggcgg	gggaagcgcac	gtggtcatga	cacagactcc	actgtccctg	480
cccgtagcc	tggcgatca	ggctagcatt	tcctgtcgaa	gttcacagag	tctggtgcac	540
tcaaacggaa	atacctatct	gcattggta	ctgcagaagc	caggccagtc	tcccaaactg	600
ctgatctata	aggtgagcaa	ccggttctcc	ggggtcctg	acagatttc	tgaaagtggc	660
tcagggacag	atttcactct	gaaaattagc	agagtggagg	ccgaagatct	ggcgtctac	720
tttttagcc	agaataccca	cgtcccacca	acattcgaa	gcggcactaa	actggaaatc	780
aaggagccca	aatcttgta	caaaactcac	acatgcccac	cgtgcccgg	tccgaaagat	840
cccaaatttt	gggtgctggt	ggtgggtgg	ggagtcctgg	cttgctatag	cttgctagta	900
acagtggcct	ttattatttt	ctgggtgagg	agtaagagga	gcaggctcct	gcacagtgac	960
tacatgaaca	tgactccccg	ccgccccggg	cccacccgca	agcattacca	gccctatgcc	1020
ccaccacgca	acttcgcagc	ctatcgctcc	agagtgaagt	tcagcaggag	cgcagacgccc	1080
cccgcttacc	agcagggcca	gaaccagctc	tataacgago	tcaatctagg	acgaagagag	1140
gagtagatg	ttttggacaa	gagacgtggc	cgggaccctg	agatgggggg	aaagccgaga	1200
aggaagaacc	ctcaggaagg	cctgtacaat	gaactgcaga	aagataagat	ggcggaggcc	1260
tacagtgaga	ttgggatgaa	aggcgagcgc	cggaggggca	aggggcacga	tggcctttac	1320
cagggtctca	gtacagccac	caaggacacc	tacgacgccc	ttcacatgca	ggccctgccc	1380
cctcgc						1386

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

<400> 13

ttttgggtgc	tggtgggtgg	tggtggagtc	ctggcttgct	atagcttgct	agtaacagtgc	60
gcctttatta	ttttctgggt	gaggagtaag	aggagcagggc	tcctgcacag	tgactacatg	120
aacatgactc	cccgccgccc	cgggcccacc	cgcaagcatt	accagcccta	tgccccacca	180
cgcgacttcg	cagcctatcg	ctcc				204

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 Ser Gly Gly Gly Ser  
130 135 140

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

5 <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

10

<210> 16

<211> 1380

<212> ADN

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 16

	atggattgga tttggcgcat tctgtttctg gtgggagccg caaccggagc acatagtcag	60
	gtccagctgc agcagtcaagg agccgaactg gtgcggcccg gcgcaagtgt caaactgtca	120
	tgcaaggcca gcgggtatac cttcacagac tacgagatgc actgggtgaa acagaccct	180
	gtgcacggcc tgaagtggat cggcgctctg gacccaaaaa cggggatac agcatattcc	240
	cagaagttta aaggaaaggc cactctgacc gctgacaaga gtcctctac tgcctacatg	300
	gagctgagga gcctgacatc cgaagatagc gccgtgtact attgcacccg cttctactcc	360
	tatacatact ggggccaggg gactctggt accgtctctg caggaggagg aggctctgga	420
	ggaggaggga gtggaggcgg gggaaagcgcgt gttcacatga cacagactcc actgtccctg	480
	cccggtgagcc tggcgatca ggctagcatt tcctgtcgaa gttcacagag tctggtgac	540
	tcaaacggaa atacctatct gcattggta ctgcagaagc caggccagtc tcccaaactg	600
	ctgatctata aggtgagcaa ccggttctcc ggggtccctg acagatttc tggaaagtggc	660
	tcagggacag atttcactct gaaaattagc agagtggagg ccgaagatct gggcgtctac	720
	tttttagcc agaataacca cgtcccacca acattcgaa gcccactaa actggaaatc	780
	aaggagccca aatcttgtga caaaactcac acatgcccac cgtccccgga tccgaaagat	840
	cccaaatttt gggtgctggt ggtgggtggt ggagtcctgg cttgctatacg cttgctagta	900
	acagttgcct ttattattaa acggggcaga aagaaactcc tgtatataatt caaacaacca	960
	tttatgagac cagtacaaac tactcaagag gaagatggct gtagctgccg atttccagaa	1020
	gaagaagaag gaggatgtga actgagagtg aagttcagca ggagcgcaga cccccccg	1080
	taccagcagg gccagaacca gctctataac gagctcaatc taggacgaag agaggagtac	1140
	gatgtttgg acaagagacg tggccggac cctgagatgg gggaaagcc gagaaggaag	1200
	aaccctcagg aaggcctgta caatgaactg cagaaagata agatggcggaa ggcctacagt	1260
	gagattggga tgaaggcga gcgccggagg ggcaaggggc acgatggct ttaccagggt	1320
	ctcagtagac ccaccaagga cacctacgac gcccctcaca tgcaggccct gccccctcgc	1380
5	<210> 17	
	<211> 126	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 17	
	aaacggggca gaaagaaaact cctgtatata ttcaaacaac catttatgag accagtacaa	60
	actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt	120
10	gaactg	126
	<210> 18	
	<211> 501	
	<212> PRT	
15	<213> <i>Homo sapiens</i>	

## ES 2 844 700 T3

&lt;400&gt; 18

Met	Asp	Trp	Ile	Trp	Arg	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Gly	Ala	Ala	Thr	Gly
1															15
Ala	His	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Arg
															30
Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe
															45
Thr	Asp	Tyr	Glu	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Thr	Pro	Val	His	Gly	Leu
															60
Lys	Trp	Ile	Gly	Ala	Leu	Asp	Pro	Lys	Thr	Gly	Asp	Thr	Ala	Tyr	Ser
65															80
Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser
															95
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val
															110
Tyr	Tyr	Cys	Thr	Arg	Phe	Tyr	Ser	Tyr	Thr	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
115															125
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser		
130															
Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	
145															160
Pro	Val	Ser	Leu	Gly	Asp	Gln	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln
															175
Ser	Leu	Val	His	Ser	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln
															190
Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg
															205
Phe	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp
															220
Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr
225															240

ES 2 844 700 T3

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  
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

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

<400> 19

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
cagaagttt	aaggaaaggc	cactctgacc	gctgacaaga	gctcctctac	tgcc tacatg	300
gagctgagga	gcctgacatc	cgaagatagc	gccgtgtact	attgcacccg	cttctactcc	360
tatacatact	ggggccaggg	gactctggt	accgtctctg	caggaggagg	aggctctgga	420
ggaggaggga	gtggaggcg	gggaagcgac	gtggtcatga	cacagactcc	actgtccctg	480
cccgtagcc	tggcgatca	ggctagcatt	tcctgtcgaa	gttcacagag	tctggtgac	540
tcaaacggaa	atacctatct	gcattggta	ctgcagaagc	caggccagtc	tcccaaactg	600
ctgatctata	aggtgagcaa	ccggttctcc	ggggtccctg	acagattttc	tggaaagtggc	660
tcagggacag	atttcactct	gaaaattagc	agagtggagg	ccgaagatct	ggcgctctac	720
ttttgtagcc	agaataacca	cgtcccacca	acattcgaa	gcggcactaa	actggaaatc	780
aaggagccca	aatcttgtga	caaaactcac	acatgcccac	cgtccccgga	tccgaaagat	840
cccaaatttt	gggtgctgg	ggtgggtgg	ggagtcctgg	cttgctata	cttgctagta	900
acagtggcct	ttattattt	ctgggtgagg	agtaagagga	gcaggctcct	gcacagtgac	960
tacatgaaca	tgactcccc	ccgccccgg	cccacccgca	agcattacca	gccctatgcc	1020
ccaccacg	acttcgcagc	ctatgc	aaacggggca	gaaagaaact	cctgtatata	1080
ttcaaacaac	catttatgag	accagtacaa	actactcaag	aggaagatgg	ctgtagctgc	1140
cgatttccag	aagaagaaga	aggaggatgt	gaactgagag	tgaagttcag	caggagcgca	1200
gacgcccccg	cgtaccagca	gggccagaac	cagctctata	acgagctaa	tctaggacga	1260
agagaggagt	acgatgttt	ggacaagaga	cgtggccgg	accctgagat	ggggggaaag	1320
ccgagaagga	agaaccctca	ggaaggctg	tacaatgaac	tgcagaaaga	taagatggcg	1380
gaggcctaca	gtgagattgg	gatgaaaggc	gagcgccgga	ggggcaaggg	gcacgatggc	1440
cttaccagg	gtctcagta	agccaccaag	gacacctacg	acgccc	ttca catgcaggcc	1500
ctgccccctc	gc					1512

## ES 2 844 700 T3

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

5 <400> 20

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

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

10 <400> 21

gacgtggtca	tgacacagac	tccactgtcc	ctgcccgtga	gcctggcgta	tcaggcttagc	60
atttcctgtc	gaagttcaca	gagtctggtg	cactcaaacg	gaaataccta	tctgcattgg	120
tacctgcaga	agccaggcca	gtctccaaa	ctgctgtatct	ataaggtgag	caaccggttc	180
tccggggtcc	ctgacagatt	ttctggaagt	ggctcaggaa	cagatttcac	tctgaaaatt	240
agcagagtgg	aggccgaaga	tctggcgctc	tactttgtta	gccagaatac	ccacgtccca	300
ccaacattcg	gaagcggcac	taaactggaa	atcaa			335

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

15 <400> 22

20

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*

5

<400> 23

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 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

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 Ser 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 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

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

# ES 2 844 700 T3

<400> 25

caggtccagc tgcagcagtc aggagccgaa ctgggtgcggc ccggcgcaag tgtcaaactg	60
tcatgcaagg ccagcgggta taccttcaca gactacgaga tgcactgggt gaaacagacc	120
cctgtgcacg gcctgaagtg gatcggcgct ctggacccaa aaaccgggta tacagcatat	180
tcccagaagt ttaaaggaaa ggccactctg accgctgaca agagctcctc tactgcctac	240
atggagctga ggagcctgac atccgaagat agccgtgtgt actattgcac ccgccttctac	300
tcctatacat actggggcca ggggactctg gtgaccgtct ctgcaggagg aggaggctct	360
ggaggaggag ggagtggagg cggggaaagc gacgtggta tgacacagac tccactgtcc	420
ctgcccgtga gcctggcgta tcaggctagc atttcctgtc gaagttcaca gagtctggtg	480
cactcaaacg gaaataaccta tctgcattgg tacctgcaga agccaggcca gtctccaaa	540
ctgctgatct ataaggtgag caaccggttc tccgggtcc ctgacagatt ttctgaaagt	600
ggctcaggga cagatttcac tctgaaaatt agcagagtgg aggccgaaga tctggcgta	660
tactttgtta gccagaatac ccacgtccca ccaacattcg gaagcggcac taaaactggaa	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 Ser 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 Gly Lys  
355 360 365

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

5 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 27

caggtccagc tgcagcagtc aggagcccaa	ctgggtgcggc	ccggcgcaag	tgtcaaactg	60
tcatgcaagg ccagcgggta	taccttcaca	gactacgaga	tgcactgggt	120
cctgtgcacg gcctgaagtg	gatcggcgct	ctggacccaa	aaaccgggaa	180
tcccagaagt ttaaaggaaa	ggccactctg	accgctgaca	agagctcctc	240
atggagctga ggagcctgac	atccgaagat	agcggcggt	actattgcac	300
tcctatacat actggggcca	ggggactctg	gtgaccgtct	ctgcaggagg	360
ggaggaggag ggagtggagg	cggggaaagc	gacgtggta	tgacacagac	420
ctgcccgtga gcctggcga	tcaggctagc	atttcctgtc	gaagttcaca	480
cactcaaacg gaaataccta	tctgcattgg	tacctgcaga	agccaggcca	540
ctgctgatct ataaggtgag	caaccggttc	tccgggtcc	ctgacagatt	600
ggctcaggga cagattcac	tctgaaaatt	agcagagtgg	aggccgaaga	660
tactttgtta gccagaatac	ccacgtcccc	ccaacattcg	gaagcggcac	720
atcaaggagc ccaaattttg	tgacaaaact	cacacatgcc	caccgtgccc	780
gatccaaat tttgggtgct	ggtgggtgtt	ggtggagtcc	tggcttgcta	840
gtaacagtgg cctttattat	tagagtgaag	ttcagcagga	gcgcagacgc	900
cagcagggcc agaaccagct	ctataacgag	ctaatctag	gacgaagaga	960
gttttggaca agagacgtgg	ccgggaccct	gagatggggg	gaaagccgag	1020
cctcaggaag gcctgtacaa	tgaactgcag	aaagataaga	tggcggaggc	1080
attggatga aaggcgagcg	ccggaggggc	aaggggcacg	atggccttta	1140
agtacagcca ccaaggacac	ctacgacgcc	cttcacatgc	aggccctgcc	1197

10

<210> 28

<211> 440

15 <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 Ser 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 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

caggtccagc tgcagcagtc aggagccgaa ctgggtgcggc ccggcgcaag tgtcaaactg 60  
tcatgcaagg ccagcgggta taccttcaca gactacgaga tgcactgggt gaaacagacc 120  
cctgtgcacg gcctgaagt gatcggcgct ctggacccaa aaaccgggta tacagcata 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	cggggaaagc	gacgtggta	tgacacagac	tccactgtcc	420
ctgcccgtga	gcctggcgta	tcaggctagc	atttcctgtc	gaagttcaca	gagtctggtg	480
cactcaaacg	gaaataccta	tctgcattgg	tacctgcaga	agccaggcca	gtctcccaa	540
ctgctgatct	ataaggtgag	caaccggttc	tccgggtcc	ctgacagatt	ttctggaagt	600
ggctcaggga	cagatttcac	tctgaaaatt	agcagagtgg	aggccgaaga	tctggcgtc	660
tactttgt	gccagaatac	ccacgtccca	ccaacattcg	gaagcggcac	taaactggaa	720
atcaaggagc	ccaaatctt	tgacaaaact	cacacatgcc	caccgtgccc	ggatccgaaa	780
gatccaaat	tttgggtgct	ggtgggggtt	ggtggagtcc	tggtttgcta	tagttgcta	840
gtaacagtgg	cctttattat	tttctgggt	aggagtaaga	ggagcaggct	cctgcacagt	900
gactacatga	acatgactcc	ccgccc	ggcccaccc	gcaagcatta	ccagccctat	960
gccccaccac	gcgacttcgc	agcctatcgc	tccagagtga	agttcagcag	gagcgcagac	1020
gcccccgct	accagcaggg	ccagaaccag	ctctataacg	agctcaatct	aggacgaaga	1080
gaggagtacg	atgttttgg	caagagacgt	ggccgggacc	ctgagatgg	ggaaagccg	1140
agaaggaaga	accctcagga	aggcctgtac	aatgaactgc	agaaagataa	gatggcggag	1200
gcctacagt	agattggat	gaaaggcgag	cggcggaggg	gcaagggca	cgtggcctt	1260
taccagggtc	tcagtacagc	caccaaggac	acctacgacg	ccttcacat	gcaggccctg	1320
ccccctcgc						1329

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 438

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 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 Ser 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 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 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*

5

<400> 31

caggtccagc	tgcagcagtc	aggagccgaa	ctgggtcgcc	ccggcgcaag	tgtcaaactg	60
tcatgcaagg	ccagcgggta	taccttcaca	gactacgaga	tgcactgggt	gaaacagacc	120
cctgtgcacg	gcctgaagtg	gatcggcgct	ctggacccaa	aaaccgggaa	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
ggctcagggaa	cagatttcac	tctgaaaatt	agcagagtgg	aggccgaaga	tctggcgtc	660
tactttgtat	gccagaatac	ccacgtccca	ccaacattcg	gaagcggcac	taaactggaa	720
atcaaggagc	ccaaatcttgc	tgacaaaact	cacacatgcc	caccgtgccc	ggatccgaaa	780
gatcccaaattt	tttgggtgct	ggtgggtggtt	ggtggagtcc	tggcttgcta	tagcttgcta	840
gtacacagtgg	cctttattat	taaacggggc	agaaagaaac	tcctgtatat	attcaaacaa	900
ccatttatga	gaccagtaca	aactactcaa	gaggaagatg	gctgtagctg	ccgatttcca	960
gaagaagaag	aaggaggatg	tgaactgaga	gtgaagttca	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	gacgccccttc	acatgcaggc	cctgccccct	1320
cgcc						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 Ser 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

## ES 2 844 700 T3

130	135	140
Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val		
145	150	155
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
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 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
Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu		
325	330	335
Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu		
340	345	350
Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys		
355	360	365
Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln		
370	375	380

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 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

5

caggccatc tgcagcagtc aggagccaa ctggcgccgc cggcgcaag tgtcaaactg	60
tcatgcagg ccagcggtt tacccatcaca gactacgaga tgcactgggt gaaacagacc	120
cctgtgcacg gcctgaagt gatcgccgtt ctggacccaa aaaccgggaa tacagcatat	180
tcccaaggat ttaaaggaaa ggccactctg accgctgaca agagctcctc tactgcctac	240
atggagctga ggagcctgac atccgaagat agcgccgtgt actattgcac cgcgttctac	300
tcctatacat actggggcca gggactctg gtgaccgtct ctgcaggagg aggaggctct	360
ggaggaggag ggagtggagg cggggaaagc gacgtggtca tgacacagac tccactgtcc	420
ctgcccgtga gcctggcgta tcaggttagc attccctgtc gaagttcaca gagtctgggt	480
cactcaaacg gaaataccta tctgcattgg tacctgcaga agccaggcca gtctccaaa	540
ctgctgatct ataagggtgag caaccggttc tccggggtcc ctgacagatt ttctggaaat	600
ggctcaggga cagatttcac tctgaaaatt agcagagtgg aggccaaga tctggcgctc	660
tactttgtt gccagaatac ccacgtccca ccaacattcg gaagccgcac taaaactggaa	720
atcaaggagc ccaaatacttg tgacaaaact cacacatgcc caccgtgccc ggatccgaaa	780
gatccaaat tttgggtgct ggtgggttt ggtggagtcc tggcttgcta tagcttgcta	840
gtacacgtgg cctttattat tttctgggtg aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt	900
gactacatga acatgactcc ccggccccc gggcccaccc gcaagcatta ccagccctat	960
gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc tccaaacggg gcagaaagaa actcctgtat	1020
atattcaaac aaccatttat gagaccagta caaactactc aagaggaaga tggctgttagc	1080
tgccgatttc cagaagaaga agaaggagga tgtgaactga gagtgaagtt cagcaggagc	1140
gcagacgccc ccgcgtacca gcagggccag aaccagctct ataacgagct caatctagga	1200
cgaagagagg agtacgtatgt tttggacaag agacgtggcc gggaccctga gatgggggaa	1260
aagccgagaa ggaagaaccc tcaggaaggc ctgtacaatg aactgcagaa agataagatg	1320
gcggaggcct acagtgagat tggatgaaa ggcgagcgcc ggagggcaa gggccacgat	1380
ggccttacc agggtctcag tacagccacc aaggacacct acgacgcct tcacatgcag	1440
gcctgcggcc ctcgc	1455

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Linfocitos T citolíticos naturales (NKT) que expresan un receptor quimérico de antígeno (CAR) que se dirige a gliptícano-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:
  - 10 (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 (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.
  - 15 2. Los linfocitos NKT para el uso de la reivindicación 1, en los que las células GPC3 positivas son células cancerosas y:
    - (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:
    - (a) dicho contacto se realiza *in vitro*; o
    - 25 (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.
  - 35 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.
  - 40 8. Los linfocitos NKT para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en los que el polinucleótido comprende además un gen suicida.

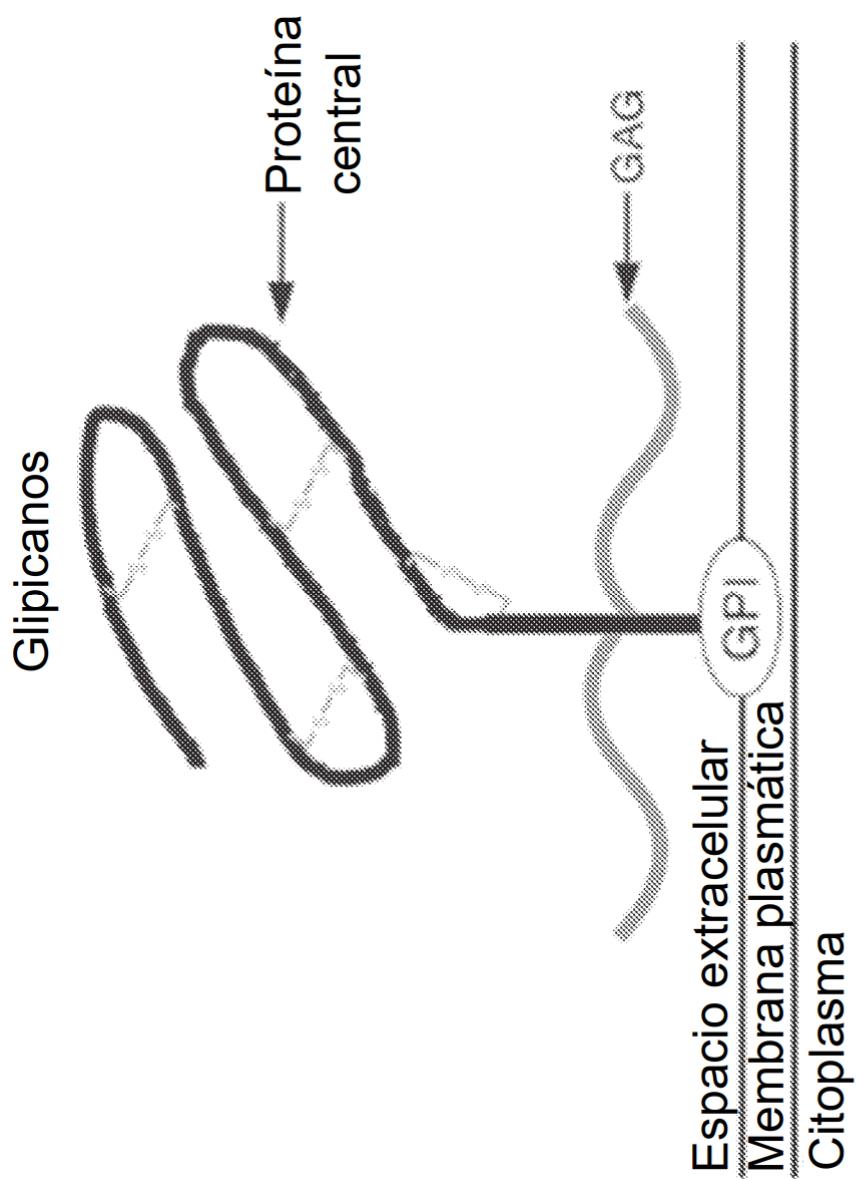


FIG. 1

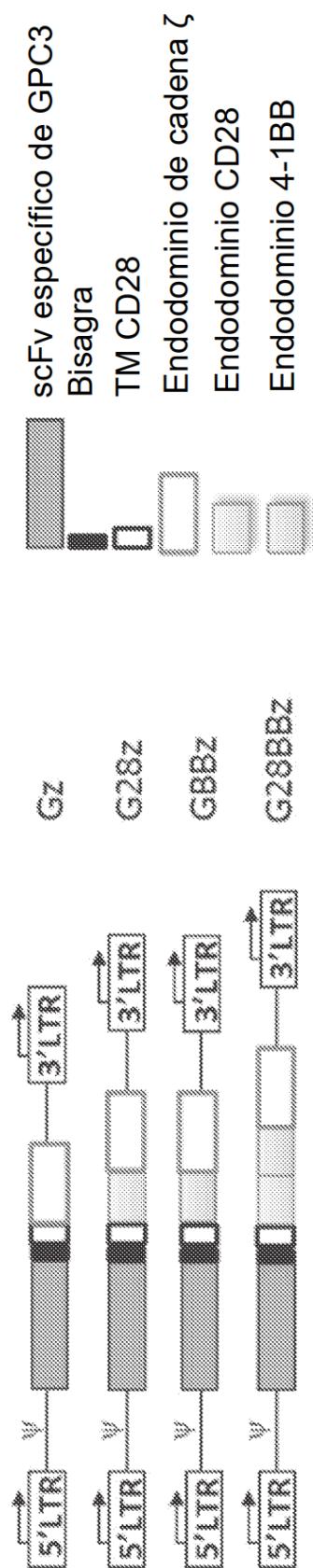
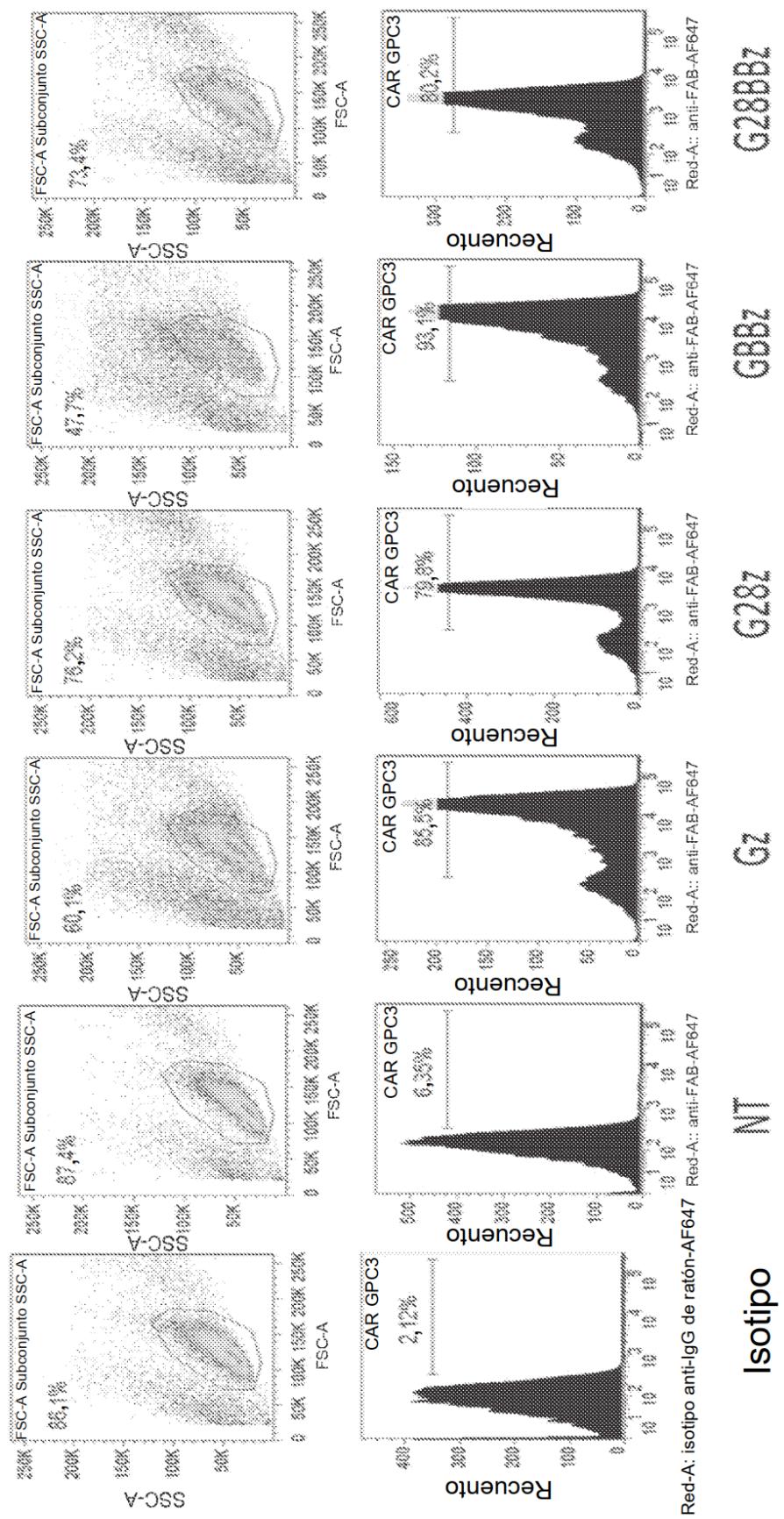


FIG. 2



三  
G  
上

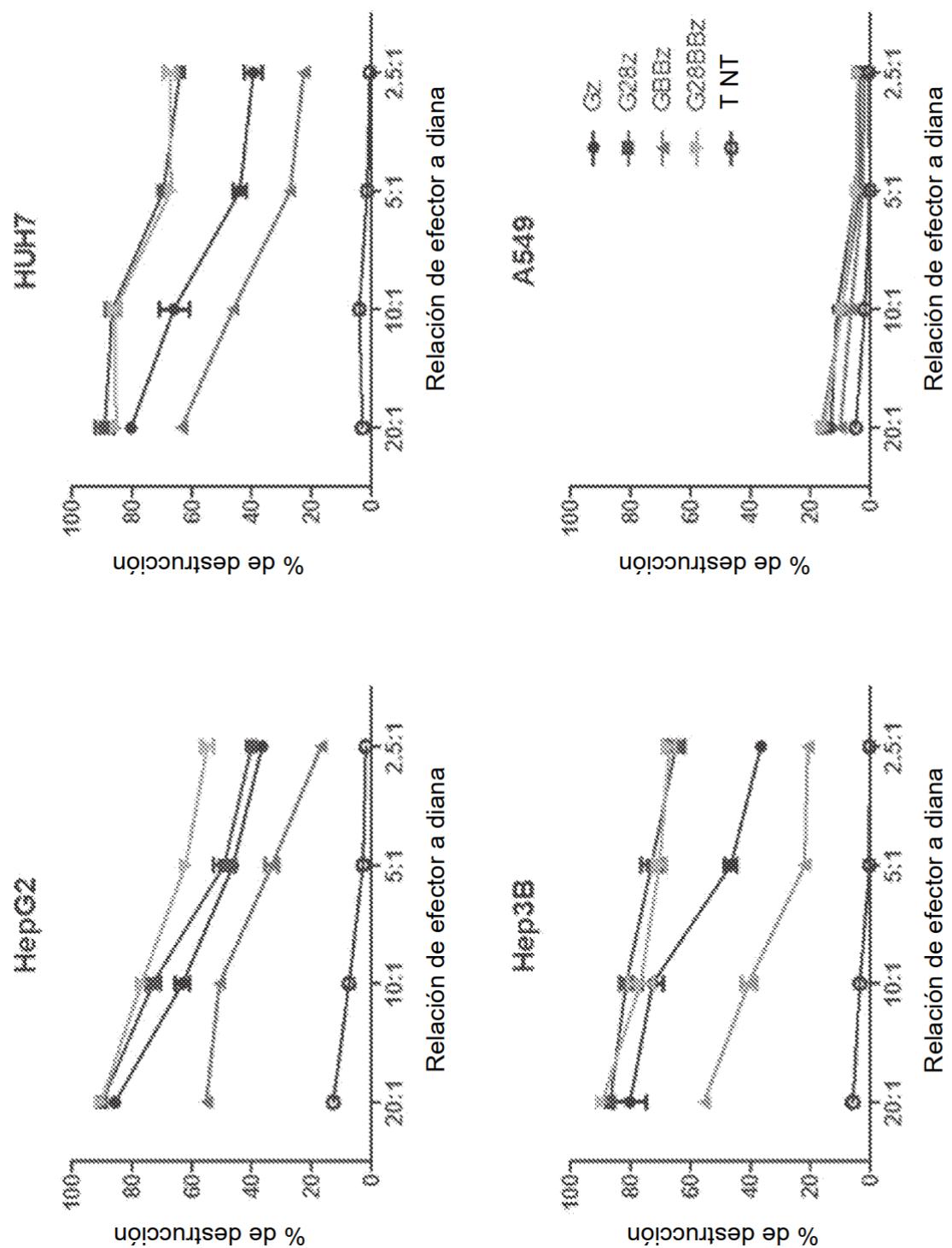


FIG. 4

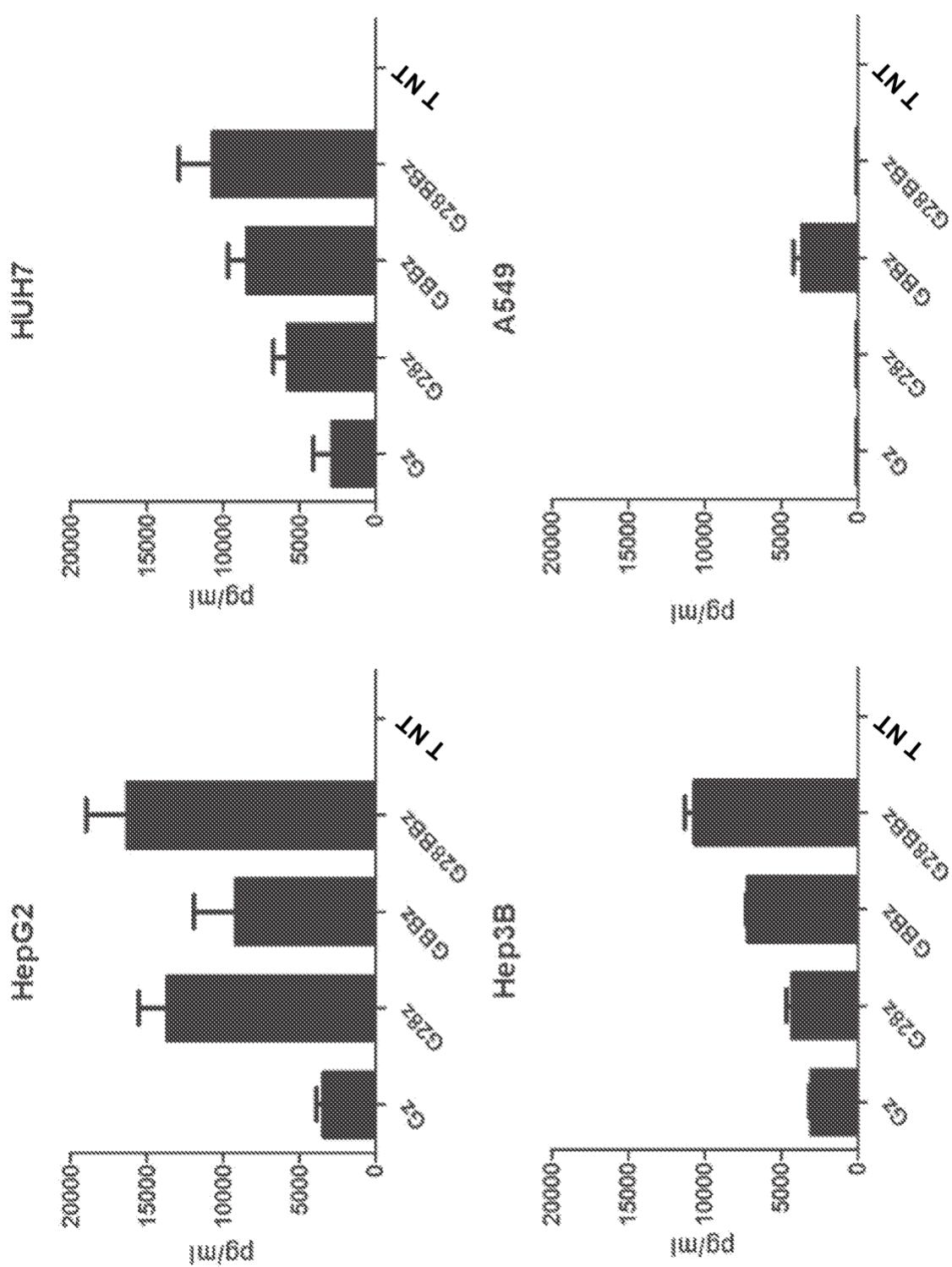


FIG. 5

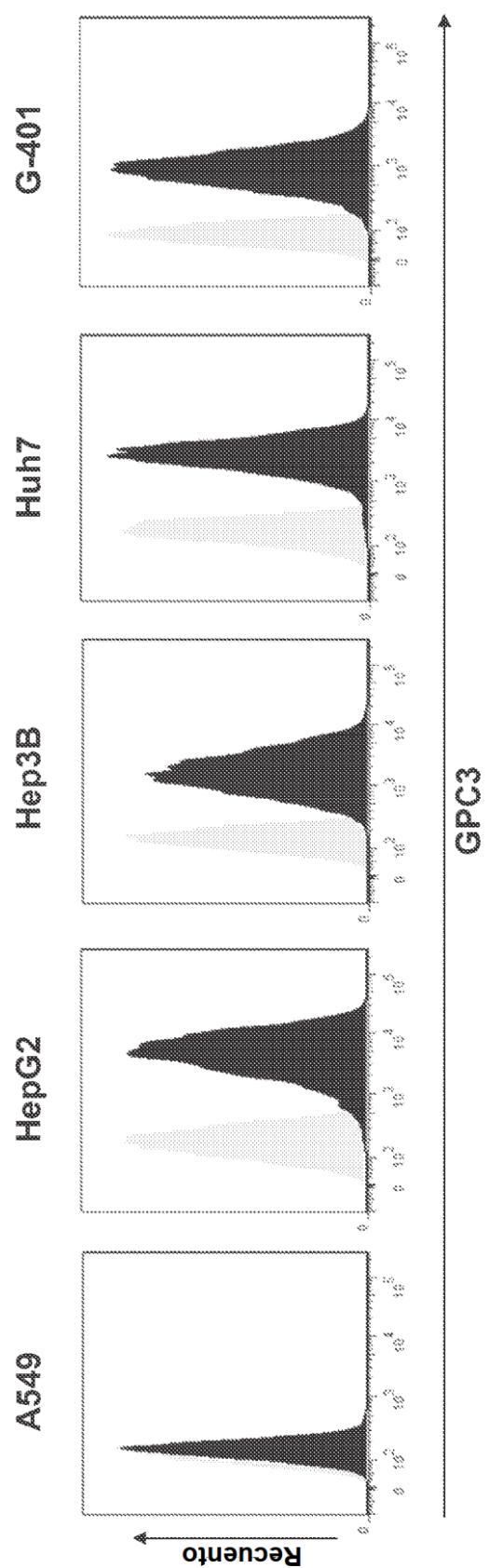
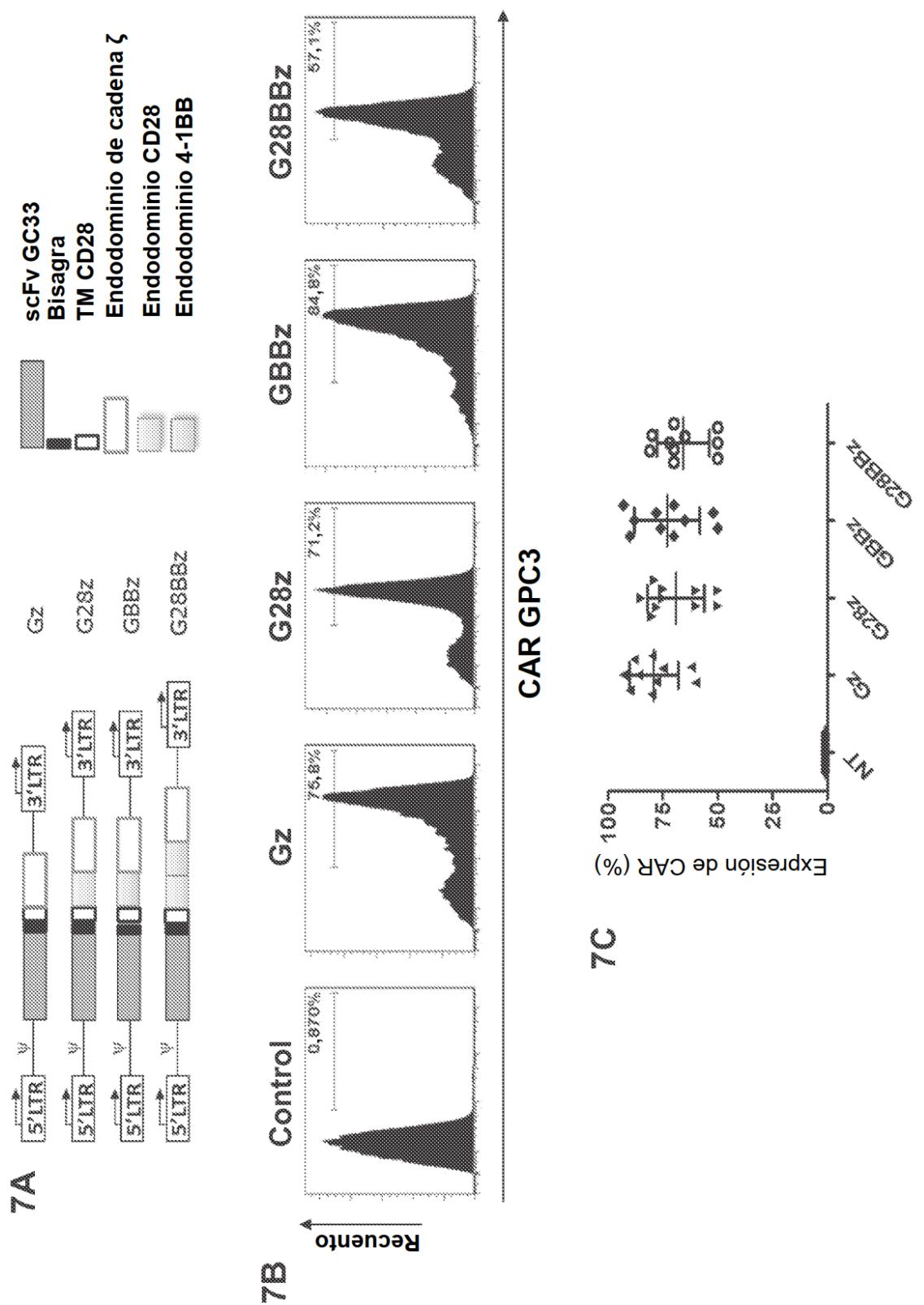
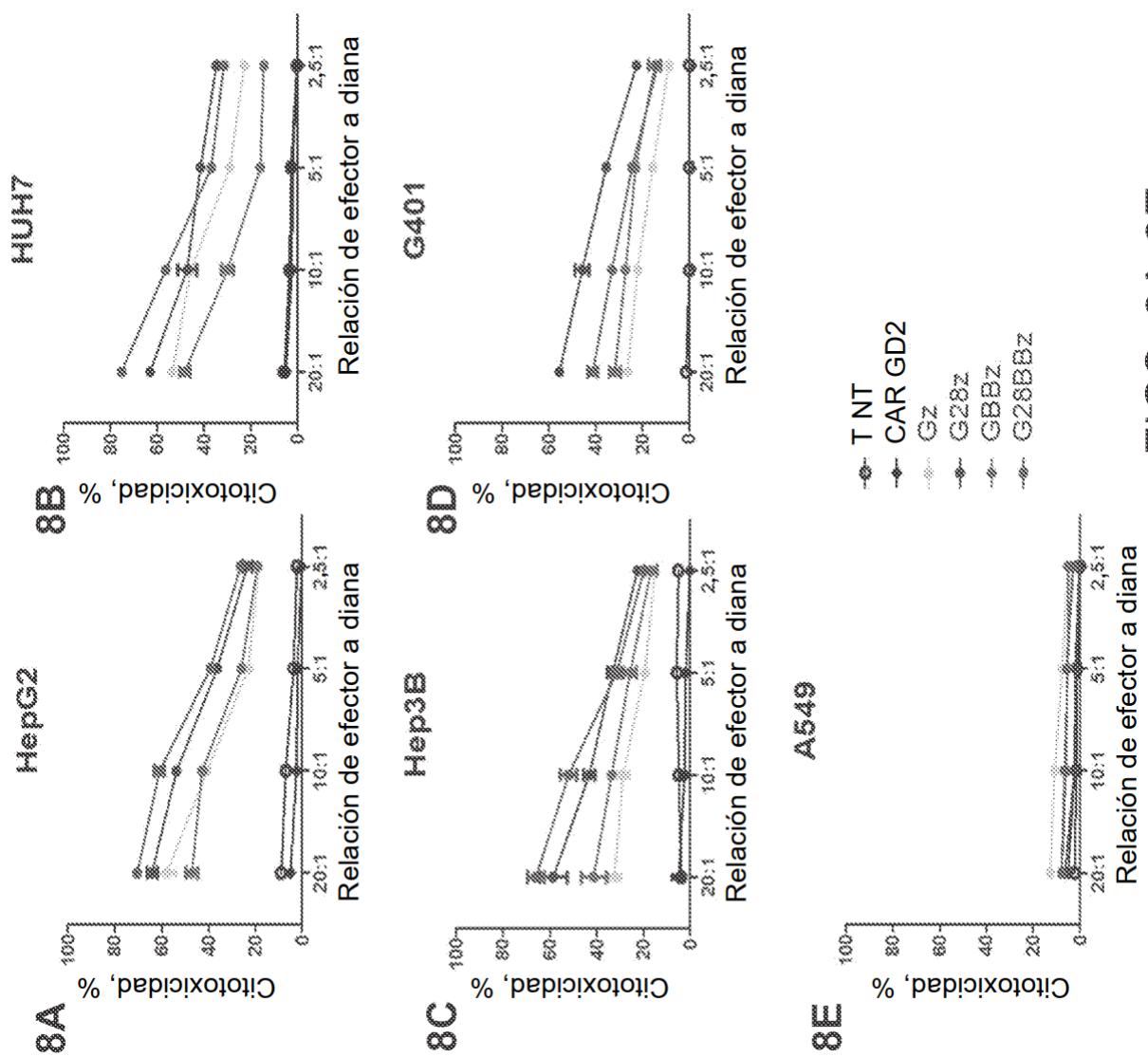


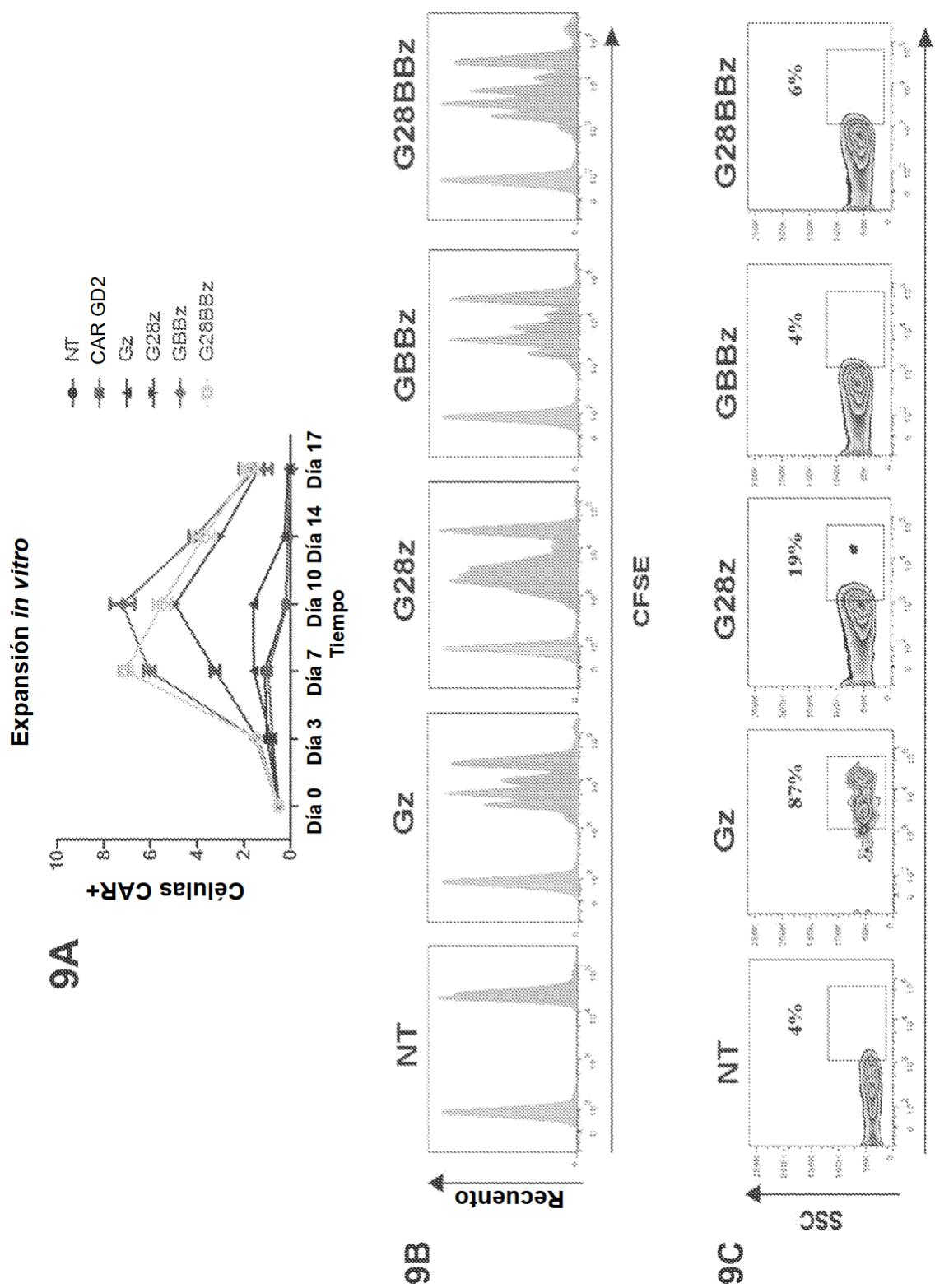
FIG. 6



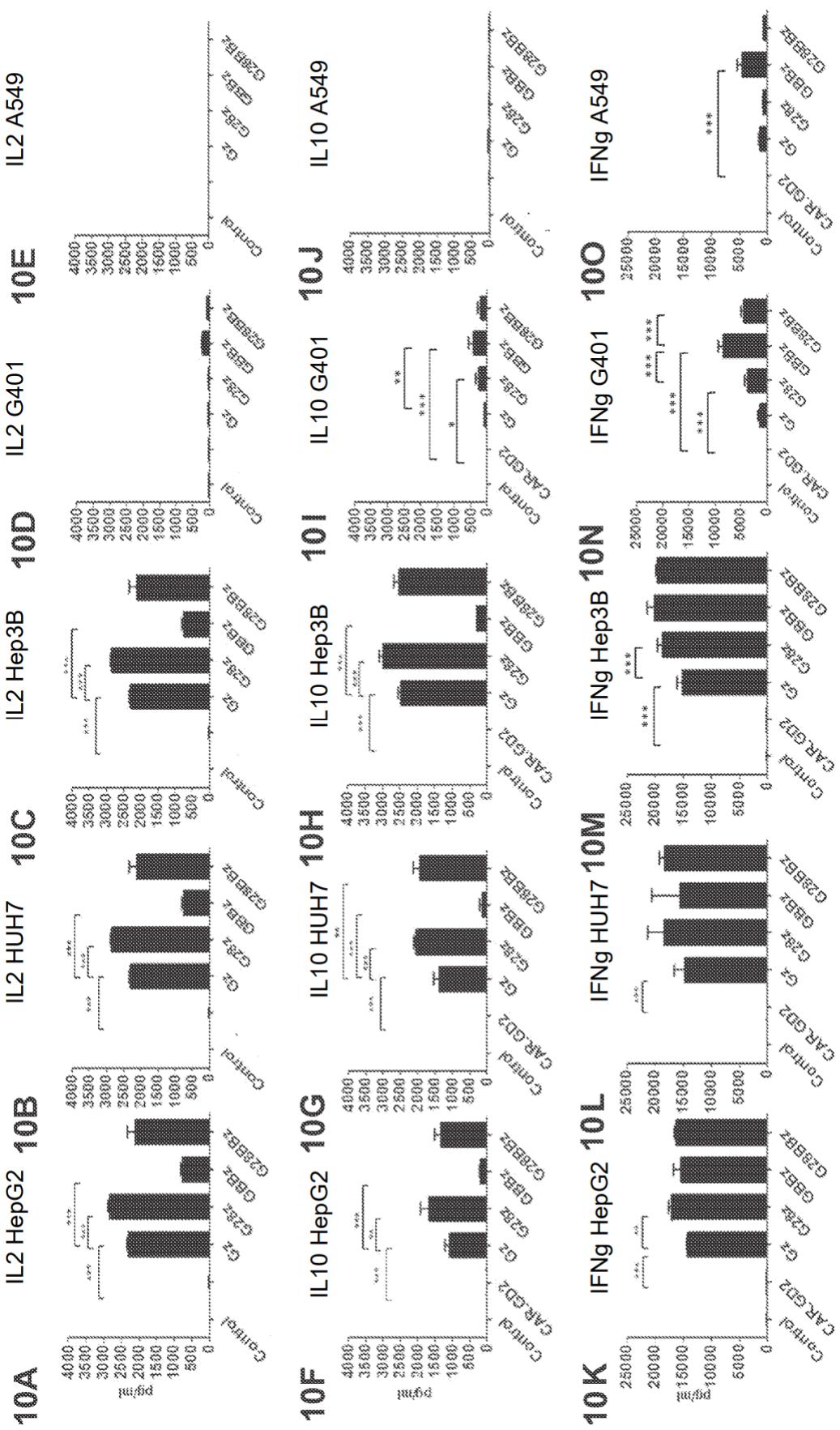
FIGS. 7A-7C



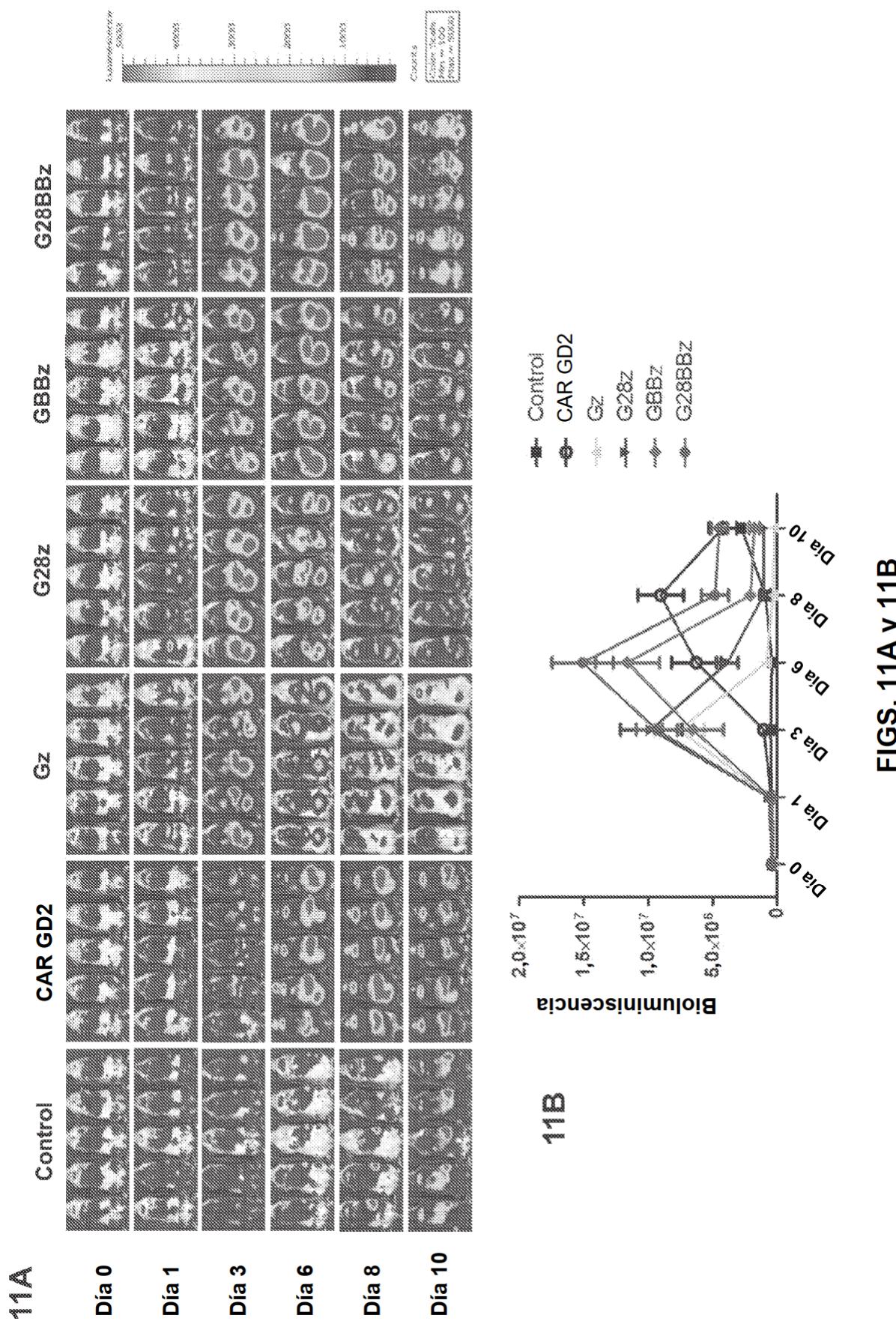
FIGS. 8A-8E



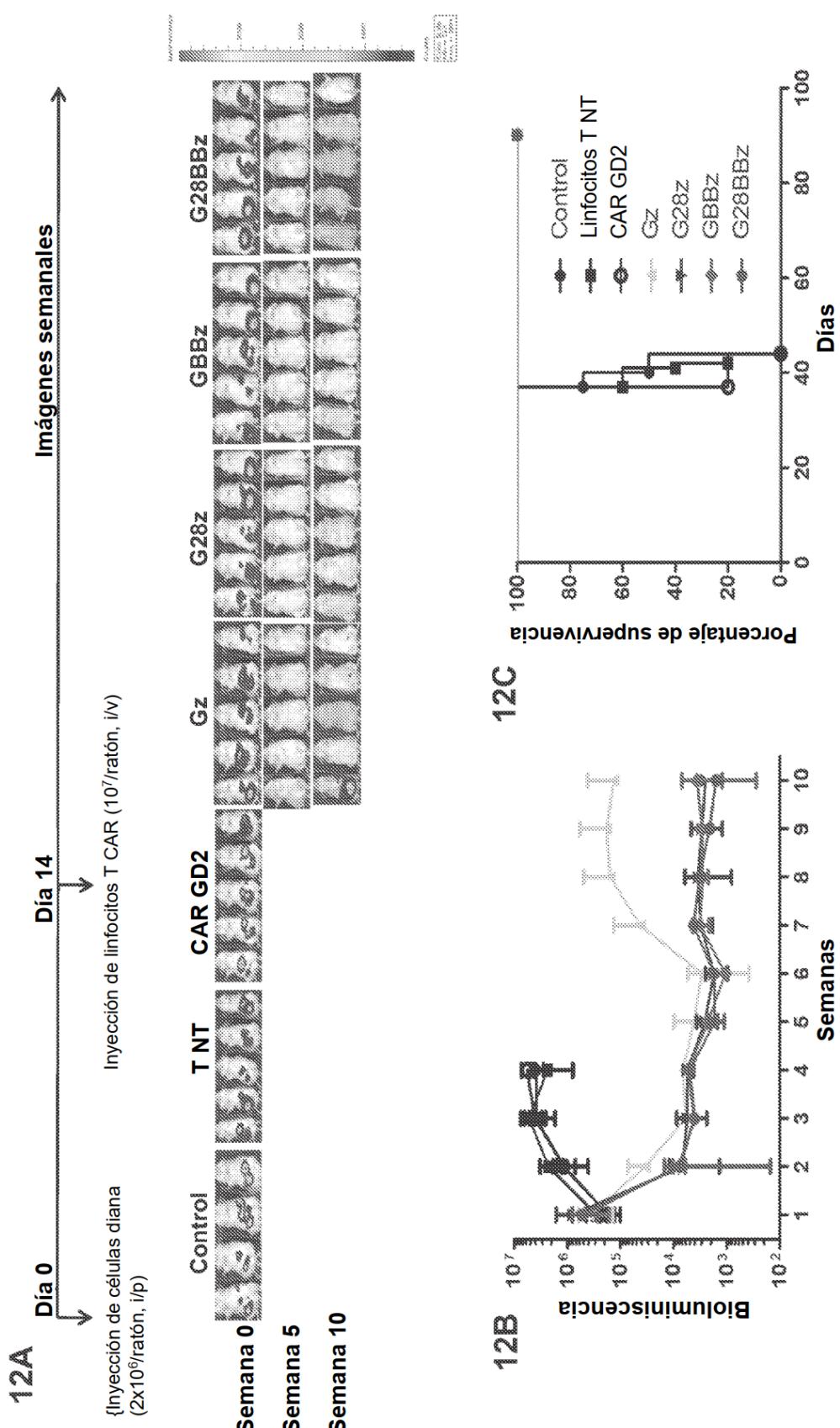
FIGS. 9A-9C



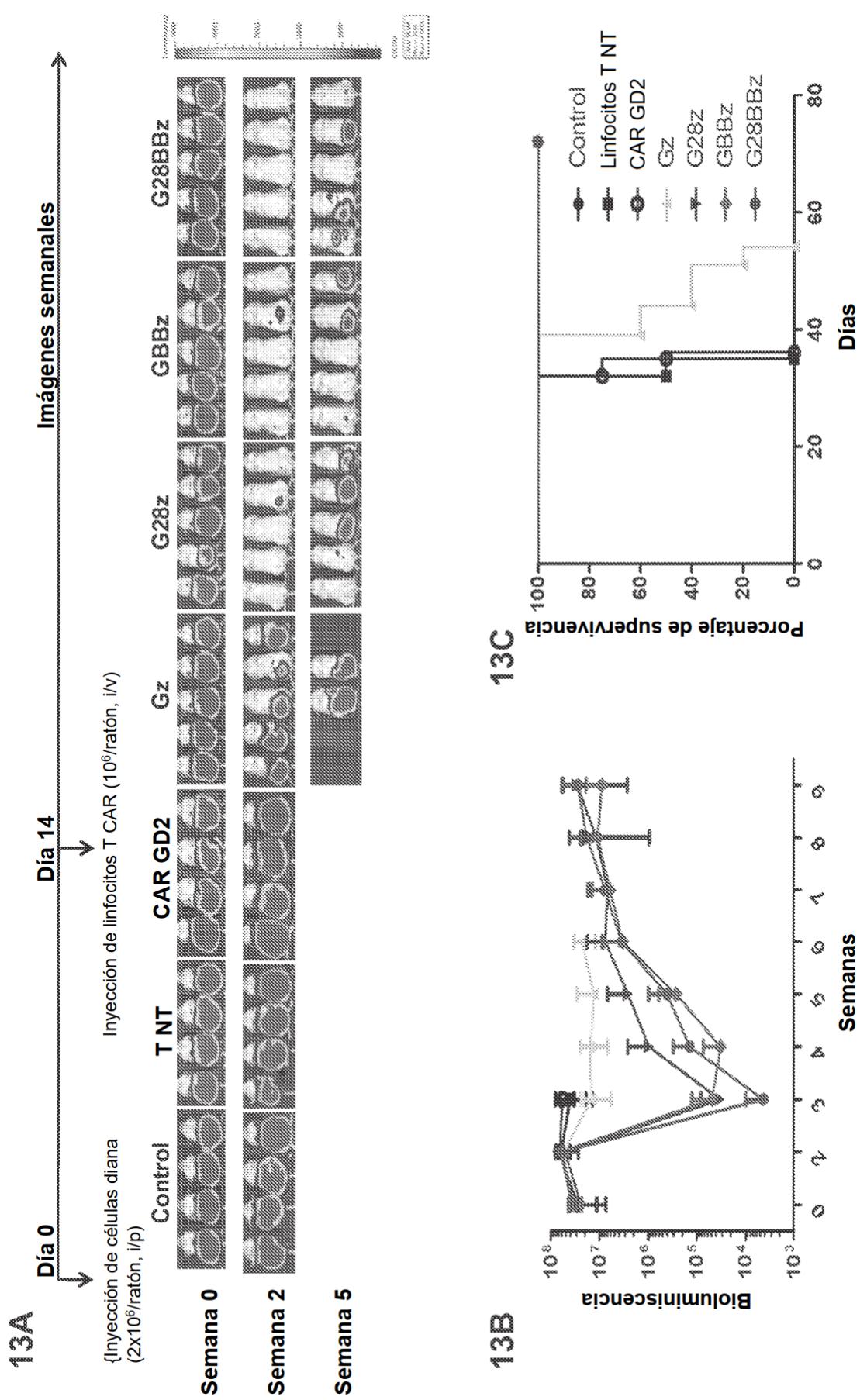
FIGS. 10A-10O



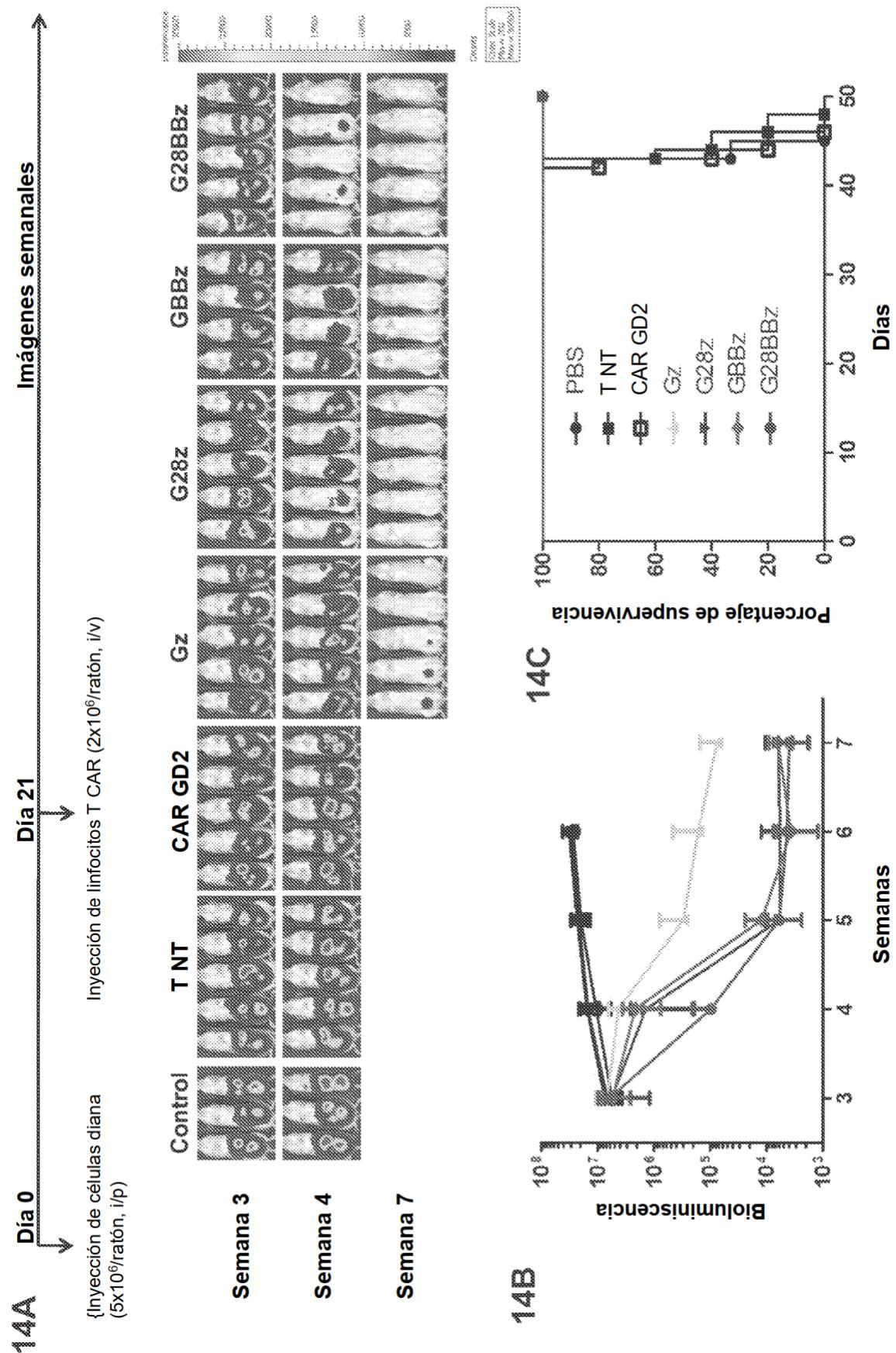
FIGS. 11A y 11B



FIGS. 12A-12C



FIGS. 13A-13C



FIGS. 14A-14C

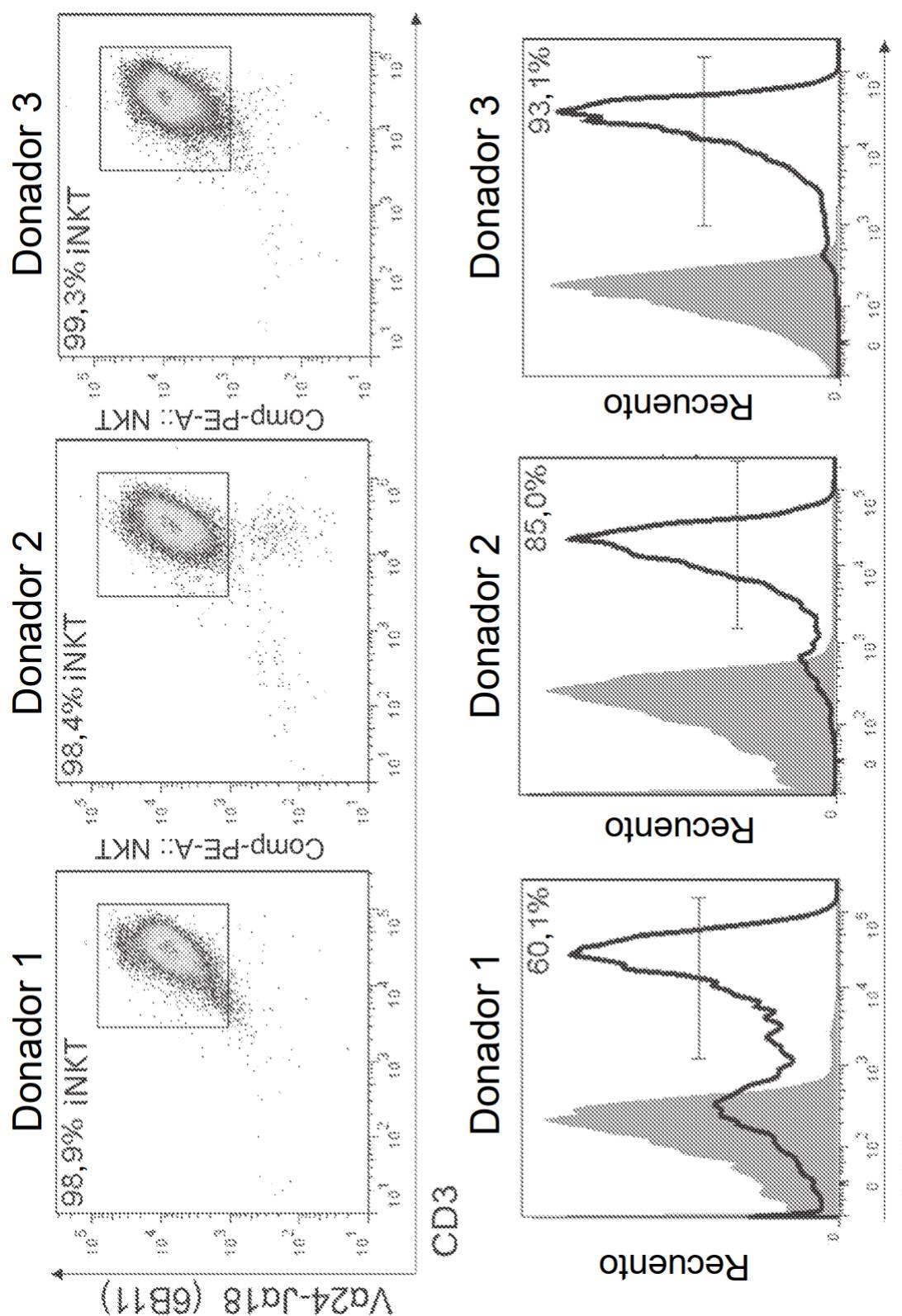


FIG. 15