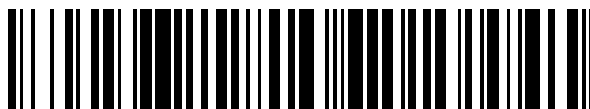


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 629**

51 Int. Cl.:

C07K 14/71 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.11.2010** **PCT/US2010/055329**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.05.2011** **WO11056894**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2010** **E 10829041 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2019** **EP 2496698**

54 Título: **Receptor del factor de crecimiento epidérmico truncado (EGFRt) para selección de células T transducidas**

30 Prioridad:

03.11.2009 US 257567 P

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

24.06.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

JENSEN, MICHAEL C.

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 717 629 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

Receptor del factor de crecimiento epidérmico truncado (EGFRt) para selección de células T transducidas

5 Campo técnico

Los presentes productos y métodos relacionados con los campos de inmunología y purificación de células modificadas genéticamente, específicamente con un receptor truncado apareado con un anticuerpo correspondiente, tal como un polipéptido derivado del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR) apareado con cetuximab, para
10 uso en inmunoterapia del cáncer.

Antecedentes

Los productos de células inmunitarias con expresión homogénea de receptores de antígenos quiméricos (CAR)
15 dirigidos a tumores son deseables para la evaluación clínica de estrategias de terapia adoptiva para eliminar la variabilidad producto a producto de la expresión transgénica, por lo demás intrínseca a la transducción y otros procedimientos de modificación genética sin posterior selección. La inmunoterapia con células inmunitarias redirigidas genéticamente es un enfoque atractivo para tratar la enfermedad residual mínima en una variedad de pacientes con
20 cáncer. Sin embargo, el rechazo inmunológico de productos celulares que expresan proteínas de selección de antibióticos como parte de la estrategia de transducción ha impedido esta estrategia. Un nuevo marcador de selección que no se expresa en linfocitos humanos, no contiene una función de señalización o tráfico endógeno, y se reconoce por un reactivo de anticuerpo de grado farmacéutico conocido, preferiblemente comercialmente disponible, que se puede utilizar para la selección, rastreo *in vivo* y el agotamiento de las células transducidas serían una mejora significativa en la técnica.

25 El documento US6790614 se refiere a un método para identificar células modificadas genéticamente usando un receptor de proteína tirosina quinasa mutada (PTKR), particularmente un receptor del factor de crecimiento epidérmico mutado (EGFR) o un miembro de la familia de la quinasa específica mutada (MuSK) como marcadores de células seleccionables.

30 Sumario

La presente invención proporciona un gen modificado del EGFR, que consiste en una secuencia que codifica un EGFR truncada que consiste en el dominio III del EGFR, el dominio transmembrana del EGFR y el dominio IV del EGFR. El
35 gen modificado del EGFR puede unirse a una secuencia de nucleótidos que codifica solo la secuencia de la señal de la cadena alfa de la GMCSFR. La secuencia de aminoácidos codificada por el gen modificado del EGFR puede ser al menos el 90% idéntico a, o consistir en, la SEQ ID NO: 3.

La presente invención proporciona además un constructo que comprende el gen de la invención, en el que el gen modificado del EGFR está acoplado con una secuencia de nucleótidos que codifica un receptor de antígeno quimérico específico para un antígeno asociado a tumor, en el que la secuencia de nucleótidos que codifica un receptor de
40 antígeno quimérico es seguido de una secuencia de nucleótidos que codifica un enlazador escindible 2A del terminal C y la secuencia de codificación para el gen modificado del EGFR.

45 El receptor de antígeno quimérico específico para un antígeno asociado a tumor se puede seleccionar entre CD19, CD20 y CD22, adecuadamente puede ser CD19. Adecuadamente, el constructo puede ser CD19R-CD28gg-Zeta (CO)-T2A-EGFRt, y puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

50 La presente invención también proporciona una población modificada genéticamente de células T transducidas con el gen de la invención, en donde el gen está acoplado a un gen que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) dirigido a tumor, en donde las células T expresan un EGFR modificado inactivo. Adecuadamente, las células T pueden usarse en inmunoterapia adoptiva. La inmunoterapia adoptiva puede ser para el tratamiento del cáncer.

55 Un epítipo de selección no inmunogénico compatible con la selección inmunomagnética facilita la inmunoterapia en pacientes con cáncer sin un rechazo inmunológico indeseable de productos celulares (es decir, como se observa cuando se expresa en proteínas de selección de antibióticos) puede generarse eliminando ciertas secuencias de aminoácidos de la proteína. El epítipo de selección no inmunogénico es un gen que codifica una molécula endógena de la superficie celular que se trunca para retener un epítipo extracelular reconocido por un anticuerpo conocido o
60 fragmento funcional del mismo, y para eliminar cualquier dominio de señalización o tráfico y/o cualquiera de los dominios extracelulares no reconocidos por el anticuerpo conocido. La eliminación de los dominios de señalización o tráfico y/o cualquiera de los dominios extracelulares no reconocidos por el anticuerpo conocido hace que la molécula endógena de la superficie celular sea inerte, que es una propiedad deseada para la molécula. El epítipo de selección no inmunogénico también se puede usar como herramienta de selección o marcador de seguimiento.

65

Por consiguiente, la presente invención proporciona un epítipo de selección no inmunogénico codificado por el gen o el constructo de la invención. Adecuadamente, el epítipo de selección puede ser para uso en un uso seleccionado de:

(a) uso como una herramienta de selección no inmunogénica que es compatible con la selección inmunomagnética; (b) uso como marcador de seguimiento para el injerto de células T *in vivo*; y (c) uso como un gen suicida para células T transducidas que tienen un potencial inmunoterapéutico, opcionalmente para uso como un gen suicida a través del complemento mediado por cetuximab y/o rutas de citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC).

Adecuadamente, el epítipo de selección puede ser compatible con la selección inmunomagnética y facilita la inmunoterapia en pacientes con cáncer sin un rechazo inmunológico indeseable de productos celulares.

Las moléculas endógenas modificadas de la superficie celular descritas en el presente documento pueden ser, pero no se limitan a, cualquier receptor relacionado con la superficie celular, ligando, glicoproteína, molécula de adhesión celular, antígeno, integrina o grupo de diferenciación (CD) que se modifica como se describe en el presente documento. La molécula endógena de superficie celular modificada es un receptor de tirosina quinasa truncado. En un aspecto, el receptor de tirosina quinasa truncado es un miembro de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (por ejemplo, ErbB1, ErbB2, ErbB3, ErbB4).

El receptor del factor de crecimiento epidérmico, también conocido como EGFR, ErbB1 y HER1, es un receptor de la superficie celular para los miembros de la familia de factores de crecimiento epidérmico de ligandos extracelulares. Las alteraciones en la actividad del EGFR se han implicado en ciertos cánceres. En un primer aspecto, un gen que codifica un polipéptido EGFR que comprende el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR) que se construye mediante la eliminación de secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos que incluyen el dominio de unión a EGF distal de membrana y la cola de señalización citoplásmica (un "EGFR truncado" o "EGFRt"), pero retiene el epítipo proximal de la membrana extracelular reconocido por un anticuerpo anti-EGFR. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal anti-EGFR conocido, disponible comercialmente, tal como cetuximab, matuzumab, necitumumab o panitumumab.

La aplicación de cetuximab biotinilado a la selección inmunomagnética en combinación con microperlas anti-biotina enriquece con éxito las células T que se han transducido de forma lentiviral con constructos que contienen EGFRt, desde un valor tan bajo como 2% de la población hasta una pureza superior al 90% sin toxicidad observable para la preparación celular. La expresión constitutiva de esta molécula del EGFRt inerte no afecta el fenotipo de las células T o la función efectora como lo indica el receptor de antígeno quimérico (CAR), CD19R, expresado de manera coordinada. A través del análisis de citometría de flujo, EGFRt se utilizó con éxito como un marcador de seguimiento *in vivo* para el injerto de células T en ratones. Además, se demostró que EGFRt tiene potencial genético suicida a través de las rutas de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mediada por Erbitux®. Por lo tanto, EGFRt puede usarse como una herramienta de selección no inmunogénica, marcador de seguimiento y gen suicida para células T transducidas que tienen potencial inmunoterapéutico. El ácido nucleico del EGFRt también puede detectarse por medios bien conocidos en la técnica.

Se divulgan métodos para descubrir y diseñar moléculas de superficie celular endógenas modificadas, truncadas o alteradas que se unen a anticuerpos, preferiblemente anticuerpos disponibles comercialmente, como se describe en este documento. Los métodos incluyen modelar la proteína de interés y truncar las porciones funcionales, mientras se dejan intactas las porciones de unión al anticuerpo. El receptor o ligando modificado resultante puede clasificarse utilizando un anticuerpo marcado y luego enriquecerse de tal manera que la concentración del receptor o ligando modificado aumente.

Se divulga en el presente documento un método de selección de células T transducidas que comprende la transducción de células T con una secuencia génica de molécula de superficie celular endógena modificada, truncada o alterada (por ejemplo, EGFR truncado) y luego la aplicación de un anticuerpo que une la secuencia del ligando o del receptor modificado a las células T transducidas. Si la secuencia del receptor modificado es EGFRt, el anticuerpo es preferiblemente un anticuerpo monoclonal anti-EGFR biotinilado. Las células T luego se clasifican agregando microperlas anti-biotina y seleccionando las células T usando separación inmunomagnética, agregando anti-biotina conjugada con fluorocromo y seleccionando las células T usando la clasificación de células activadas por fluorescencia, o cualquier otro método confiable de clasificación de las células. Las secuencias del ligando o receptor modificadas, tales como la secuencia del EGFRt, pueden estar contenidas en un vehículo de transferencia adecuado tal como un vector lentiviral.

Estas y otras realizaciones se explican con más detalle en los dibujos y la descripción detallada en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un modelo molecular de proteínas del EGFR frente al EGFRt basadas en los archivos de estructura cristalina. La estructura del EGFR a la izquierda muestra un EGFR de longitud completa con la estructura de los cuatro

dominios extracelulares (Dominios I-IV). La estructura central muestra el EGFR truncado (EGFRt), que carece del Dominio I, el Dominio II, el Dominio yuxtamembrana y el Dominio con actividad Tirosina Quinasa en comparación con un EGFR no modificado. El EGFRt a la derecha muestra una estructura truncada unida al Fab Eribitux®, compuesta por V_H-C_{H1} y V_L-C_L. Los dominios están separados con líneas de puntos.

La Figura 2 ilustra la selección de células T EGFRt⁺ utilizando cetuximab biotinilado (denominado en la Figura como Eribitux®). La Figura 2a es un esquema del proceso de biotinilación y reformulación del cetuximab. La Figura 2b es una gráfica que muestra la titulación de cetuximab biotinilado. Se tiñeron 10⁶ células EGFR⁺ con 0 µg (negro), 1,45 µg (rojo), 0,145 µg (naranja), 14,5 ng (amarillo), 1,45 ng (verde), 0,145 ng (azul) o 14,5 pg (púrpura) de cetuximab biotinilado seguido de 0,5 µg de estreptavidina conjugada con PE y analizaron por citometría de flujo. Se consideraron suficientes 14,5 ng o más de cetuximab biotinilado para tinción adicional. La Figura 2c muestra esquemas de los procedimientos de selección del EGFRt inmunomagnético (arriba) y de clasificación de células activadas por fluorescencia (abajo).

La Figura 2d muestra la selección inmunomagnética de varias líneas de células T transducidas de forma lentiviral con constructos que contienen CAR y EGFRt. Los esquemas de los constructos CD19CAR-T2A-EGFRt (izquierda) y CD19CAR-T2A-EGFRt-IMPDH2dm (derecha) contenidos en vectores lentivirales se muestran más arriba de los análisis citométricos de flujo de selección previa y posterior correspondiente para la expresión del EGFRt de superficie. Se indican las porciones de secuencia optimizadas de codón del CAR específico de CD19 coestimulador de CD28, seguidos de los marcadores de selección autoescindibles T2A, EGFRt e IMPDH2dm, junto con las secuencias promotoras del Factor 1 de Elongación (EF-1p), y las secuencias de señales de cadena de alfa GCSFR (GCSFRss, que dirige la expresión de superficie). Se realizó un análisis citométrico de flujo de líneas de células T transducidas de forma lentiviral que se habían teñido con un anticuerpo de cetuximab biotinilado y un anticuerpo antibiotina conjugado con PE (histogramas con relleno) en las células T de entrada (PRE SLXN) y la fracción positiva obtenida de AutoMACS^{MR} (POS FRXN). Los histogramas sin relleno representan la tinción con un anticuerpo antibiotina conjugado con PE solamente, y el porcentaje de células positivas se indica en cada histograma. La selección de la Línea A CD19CAR⁺EGFRt⁺ ocurrió 3 días después de la transducción de los blastos de células T. La selección de la Línea B CD19CAR⁺EGFRt⁺ ocurrió después de 3 estimulaciones REM de células derivadas de T_{CM} específicas de CMVpp65 transducidas. La selección de la Línea C CD19CAR⁺EGFRt⁺ se produjo después de 2 estimulaciones REM de células derivadas de T_{CM} CD8⁺ transducidas. La selección de la Línea D CD19CAR⁺EGFRt⁺ ocurrió después de 1 estimulación con REM de células derivadas de T_{EM} transducidas. La selección de la Línea E CD19CAR⁺EGFRt⁺IMPDH2dm⁺ ocurrió después de 1 estimulación con REM de las células derivadas de T_{CM} transducidas.

La Figura 3 muestra que el EGFRt expresado en células T seleccionadas es inerte. En la Figura 3a, EGFRt expresado en células T no se fosforila después de la incubación con EGF. Se incubaron células T de control negativas, células de línea A CD19CAR⁺EGFRt⁺ o células A431 durante 5 minutos con o sin 100 ng/mL de EGF o cetuximab (denominado en la Figura como Erbtx) y luego se lisaron en presencia del inhibidor de fosfatasa. Los lisados procesados en transferencias Western se sondearon utilizando anticuerpos específicos para β-actina, el dominio citoplasmático del EGFR o la tirosina fosforilada en la posición 1068 del EGFR. La Figura 3b muestra que EGF no se une a la superficie de las células T que expresan EGFRt. A431, la línea A y las células T de control negativo se tiñeron con anti-EGFR conjugado con PE, o bien cetuximab biotinilado o EGF biotinilado seguido de estreptavidina conjugada con PE (histograma con relleno) frente al Ab de control de isotipo conjugado con PE o estreptavidina sola (histograma sin relleno) por citometría de flujo. El porcentaje de tinción positiva está indicado en cada histograma.

La Figura 4 ilustra que las células T EGFRt⁺ CD19⁺ se pueden expandir con el mantenimiento del fenotipo efector. La Figura 4a es una gráfica de líneas que muestra la expansión de las células T seleccionadas con EGFRt, Líneas A-E, durante 12 o más días después de que se inició la estimulación rápida del medio de expansión (REM) el día de la selección de AutoMACS^{MR} (día 0). (MACS es la clasificación celular activada magnéticamente). La expansión de las células T en el medio de expansión rápida (REM) involucró la incubación de 10⁶ células T con 30 ng/mL de anti-CD3ε (OKT3; Ortho Biotech, Raritan, NJ), 5 x 10⁷ PBMC irradiadas con radiación γ (3500 cGy) y 10⁷ LCL irradiadas con radiación γ (8.000 cGy) en 50 mL de CM; con la adición de 50 U/mL de rIL-2 y 10 ng/mL de rIL-15 (CellGenix) cada 48 horas, a partir del día 1. Las células T se volvieron a estimular de esta manera cada 14 días. La Figura 4b muestra histogramas que representan células T seleccionadas con EGFRt (11 a 13 días después de la estimulación) que se fenotiparon para EGFR de superficie (es decir, EGFRt, con cetuximab biotinilado), Fc (es decir, CAR) y marcadores de células T CD4 o CD8, (histograma con relleno) frente a Ab de control de isotipo (histograma sin relleno) por citometría de flujo. El porcentaje de tinción positiva está indicado en cada histograma. "N.D." indica que no hay datos. La Figura 4c son gráficos de cinco líneas, una para cada una de las Líneas A-E, de células T seleccionadas con EGFRt (dentro de los 11 a 15 días posteriores a la estimulación con REM) incubadas durante 4 horas con células NS0, marcado con ⁵¹Cr, U251T, NS0 que expresan CD19t, U251T que expresan pp65 del CMV, Daudi o SupB15 que expresan CD19, o LCL que expresan OKT3 como objetivos en las proporciones E:T indicadas. La liberación de cromo se midió para determinar la actividad citotóxica. La Figura 4d es una gráfica que muestra la resistencia a MPA de la Línea E CD19CAR⁺EGFRt⁺IMPDH2dm⁺. Las células T de control que no expresan IMPDH2dm y las células de la Línea E que expresan IMPDH2dm seleccionadas con EGFRt se cultivaron ya sea con o sin MPA 1 µM y se monitorizó el número de células totales.

La Figura 5 muestra que la expresión del EGFRt se puede usar como marcador de seguimiento para el injerto de células T *in vivo*. El Día 36, se tiñó la médula ósea recolectada de un ratón de control o de un ratón que había recibido 10⁷ células de la Línea C CD19CAR⁺EGFRt⁺ el día 0 usando CD45 anti-humano conjugado con PerCP y cetuximab biotinilado ("Bio- Erb") seguido por estreptavidina conjugada con PE. Los cuadrantes se crearon en función de la tinción del control de isotipo y el porcentaje de tinción positiva en cada cuadrante se indica en cada histograma.

La Figura 6 es una gráfica que muestra las células T de los objetivos de expresión del EGFRt para ADCC mediada por cetuximab (denominadas en la figura como Erbitux®). Las células de la línea A marcadas con ⁵¹Cr se incubaron previamente con o sin hasta 20 µg/mL de cetuximab o mAb Rituxan específico de CD20 como control negativo antes de la adición de PBMC humana como efectores.

La Figura 7 son las secuencias de los nucleótidos (la cadena sentido es la SEQ ID NO: 1, la cadena antisentido es la SEQ ID NO: 2) y de aminoácidos (SEQ ID NO: 3) de la secuencia señal de la cadena alfa de GMCSFR unida a EGFRt. La secuencia señal de la cadena alfa de GMCSFR, que dirige la expresión en la superficie, está codificada por los nucleótidos 1-66. EGFRt está codificada por los nucleótidos 67-1071.

La Figura 8 son las secuencias de nucleótidos (la cadena sentido es la SEQ ID NO: 4, la cadena antisentido es la SEQ ID NO: 5) y de aminoácidos (SEQ ID NO: 6) de CD19R-CD28gg-Zeta(CO)-T2A-EGFRt. CD19R-CD28gg-Zeta(CO) está codificada por los nucleótidos 1-2040; T2A está codificado por los nucleótidos 2041-2112; GMCSFR está codificada por los nucleótidos 2113-2178; EGFRt está codificada por los nucleótidos 2179-3186.

La Figura 9 es una gráfica que muestra la expresión de CD19R-CD28gg-Zeta(CO)-T2A-EGFRt. La transducción de blastos de células T primarias estimuladas con perlas anti-CD3/anti-CD28 con el vector lentiviral CD19R-CD28gg-Zeta(CO)-T2A-EGFRt_epHIV7 (MOI = 3) da como resultado la detección en la superficie de ambos CAR (utilizando un Ab anti-Fc biotinilado y estreptavidina-PE) y la molécula EGFR truncada (usando un Ab cetuximab biotinilado y estreptavidina-PE) por citometría de flujo en el día 4. El pico blanco en cada panel son blastos de células T de control no transducidas.

La Figura 10 es un esquema que muestra un posible flujo de proceso para ensayos clínicos para probar productos de la presente divulgación.

Descripción detallada

Ciertas realizaciones de la invención se describen en detalle, usando ejemplos específicos, secuencias y dibujos.

Erbitux® es una marca registrada para el anticuerpo monoclonal anti-EGFR cetuximab y se pretende que incluya de manera independiente la formulación del producto de nombre comercial, el medicamento genérico y el ingrediente o ingredientes farmacéuticos activos del producto de nombre comercial.

El término "modificación genética" significa cualquier proceso que agrega, elimina, altera o interrumpe una secuencia de nucleótidos endógena e incluye, pero no se limita a, transferencia de genes mediada por virus, transferencia mediada por liposomas, transformación, transfección y transducción, por ejemplo, transferencia génica mediada por virus, tal como el uso de vectores basados en virus de ADN como lentivirus, adenovirus, retrovirus, virus adenoasociados y virus del herpes.

El término "anticuerpo" incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, dímeros, multímeros, anticuerpos multiespecíficos y fragmentos de anticuerpos que pueden ser humanos, de ratón, humanizados, quiméricos o derivados de otra especie. Un "anticuerpo monoclonal" es un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos que se dirige contra un sitio antigénico específico.

"Variante" se refiere a polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos que difieren en cierta medida de un polipéptido de secuencia nativa. Normalmente, las variantes de la secuencia de aminoácidos poseerán al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia, más preferiblemente, al menos aproximadamente 90% de homología por secuencia. Las variantes de la secuencia de aminoácidos pueden poseer sustituciones, supresiones y/o inserciones en ciertas posiciones dentro de la secuencia de aminoácidos de referencia.

La "identidad porcentual" o "el porcentaje de identidad" se define como el porcentaje de residuos en la variante de secuencia de aminoácidos que son idénticos después de alinear mejor las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia. Los métodos y programas informáticos para la alineación son bien conocidos en la técnica. Tales programas incluyen GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST o Align 2.

"Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" y "ADCC" se refieren a una reacción mediada por células en la que las células citotóxicas no específicas que expresan receptores Fc, tal como células asesinas naturales, los neutrófilos y los macrófagos, reconocen el anticuerpo unido en una célula objetivo y causa la lisis de la célula objetivo. La actividad de ADCC se puede evaluar utilizando métodos, tales como aquellos descritos en la patente de Estados Unidos N° 5.821.337.

Las "células efectoras" son leucocitos que expresan uno o más receptores de región constante y realizan funciones efectoras.

Para "tratar" una enfermedad o un trastorno, tal como el cáncer, significa tomar medidas terapéuticas o medidas preventivas para disminuir o mermar la enfermedad o trastorno. Dicho tratamiento incluye la prevención, el alivio de los síntomas, la disminución o estabilización del alcance y/o la remisión.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un compuesto o molécula eficaz para tratar una enfermedad o trastorno.

"Cáncer" se refiere a células que experimentan un crecimiento celular incontrolado. Los ejemplos de cáncer incluyen cáncer colorrectal y cáncer de cabeza y cuello. Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer.

Una "citoquina" es una proteína liberada por una célula para actuar sobre otra célula como mediador intercelular.

"No inmunogénico" se refiere a un material que no inicia, provoca o mejora una respuesta inmunitaria en la que la respuesta inmunitaria incluye las respuestas inmunitarias adaptativas y/o innatas.

El término "gen" significa el segmento de ADN involucrado en la producción de una cadena polipeptídica; incluye las regiones que preceden y siguen a la región de codificación "líder y tráiler", así como las secuencias intermedias (intrones) entre los segmentos de codificación individuales (exones). Se pueden desarrollar algunos genes que carecen, total o parcialmente, de intrones. Algunas secuencias líderes pueden mejorar la traducción del ácido nucleico en polipéptidos.

El término "aislado" significa que el material se remueve de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural si se presenta en forma natural). Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido presente en la naturaleza en un animal vivo no se aísla, pero se aísla el mismo polinucleótido o polipéptido, separado de algunos o todos los materiales coexistentes en el sistema natural. Dichos polinucleótidos podrían ser parte de un vector y/o tales polinucleótidos o polipéptidos podrían ser parte de una composición, y todavía estar aislados, ya que dicho vector o composición no es parte de su entorno natural.

Como se usa en el presente documento, un "vector" puede ser cualquier agente capaz de administrar o mantener ácido nucleico en una célula huésped, e incluye vectores virales (por ejemplo, vectores retrovirales, vectores lentivirales, vectores adenovirales o vectores virales adeno-asociados), plásmidos, ácidos nucleicos desnudos, ácidos nucleicos complejados con polipéptidos u otras moléculas y ácidos nucleicos inmovilizados sobre partículas de fase sólida. La secuencia de ADN apropiada puede insertarse en el vector mediante una variedad de procedimientos. En general, la secuencia de ADN se inserta en un sitio o sitios de endonucleasas de restricción apropiados mediante procedimientos conocidos en la técnica. Tales procedimientos y otros se consideran dentro del alcance de los expertos en la técnica. La transcripción del ADN que codifica los polipéptidos de la presente invención por eucariotas superiores se incrementa insertando una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos del ADN que actúan en cis, generalmente de aproximadamente 10 a 300 pb que actúan sobre un promotor para aumentar su transcripción. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación de las pb 100 a 270, un potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación y los potenciadores de adenovirus.

"Receptor" significa un polipéptido que es capaz de unirse específicamente a una molécula. Mientras que muchos receptores pueden operar típicamente en la superficie de una célula, algunos receptores pueden unirse a los ligandos cuando están ubicados dentro de la célula (y antes del transporte a la superficie) o pueden residir predominantemente intracelularmente y unirse al ligando en la misma.

"Anticuerpo o fragmento funcional del mismo" significa una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente a, o es inmunológicamente reactiva con un antígeno o epítipo particular, e incluye tanto anticuerpos policlonales como monoclonales. El término anticuerpo incluye formas de inmunoglobulinas modificadas genéticamente o modificadas de otra forma, tales como intracuerpos, peptidocuerpos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos completamente humanos, anticuerpos humanizados y anticuerpos heteroconjugados (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos). El término fragmento de anticuerpo funcional incluye fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos, que incluyen, por ejemplo, fragmentos Fab', F(ab')₂, Fab, Fv, rIgG y scFv. El término scFv se refiere a un anticuerpo Fv de cadena única en el que los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera de un anticuerpo tradicional de dos cadenas se han unido para formar una cadena.

En una realización, se proporciona un gen que codifica un gen modificado del EGFR, que consiste en una secuencia que codifica un EGFR truncado que consiste en el Dominio de EGFR III, el dominio transmembrana del EGFR y el Dominio IV del EGFR, se puede usar como un epítipo de selección no inmunogénico compatible con selección inmunomagnética. Tal epítipo de selección no inmunogénico puede facilitar la inmunoterapia en pacientes con cáncer sin un rechazo inmunológico indeseable de productos celulares. El gen modificado del EGFR retiene un epítipo extracelular reconocido por un anticuerpo conocido o fragmento funcional del mismo, y para remover cualquier dominio de señalización o tráfico y/o cualquier dominio extracelular no reconocido por dicho anticuerpo conocido. Una molécula de superficie celular endógena modificada que carece de un dominio de señalización o tráfico y/o cualquier dominio extracelular no reconocido por dicho anticuerpo conocido se vuelve inerte.

Las moléculas de superficie celular endógenas modificadas descritas en el presente documento son cualquier receptor relacionado con la superficie celular no inmunogénico, glicoproteína, molécula de adhesión celular, antígeno, integrina o grupo de diferenciación (CD) que se modifica como se describe en el presente documento. La modificación de tales moléculas de la superficie celular se logra manteniendo un epítipo que es reconocido por un anticuerpo conocido o

fragmento funcional del mismo; y remover cualquier dominio de señalización o tráfico y/o cualquier dominio extracelular no reconocido por un anticuerpo conocido. La remoción de los dominios de señalización o tráfico y/o cualquier dominio extracelular no reconocido por un anticuerpo conocido hace que la molécula endógena de la superficie celular no sea inmunógena y/o inerte.

Los ejemplos de moléculas endógenas de la superficie celular que pueden modificarse o truncarse incluyen, entre otras, EpCAM, VEGFR, integrinas (por ejemplo, integrinas $\alpha\beta 3$, $\alpha 4$, $\alpha 11\beta 3$, $\alpha 4\beta 7$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha\beta 3$, $\alpha\gamma$), la superfamilia de receptores de TNF (por ejemplo, TRAIL-R1, TRAIL-R2), el receptor del PDGF, el receptor de interferón, el receptor de folato, GPNMB, ICAM-1, HLA-DR, CEA, CA-125, MUC1, TAG-72, receptor de IL-6, 5T4, GD2, GD3, o grupos de diferenciación (por ejemplo, CD2, CD3, CD4, CD5, CD11, CD11a/LFA-1, CD15, CD18/ITGB2, CD19, CD20, CD22, CD23, receptor de CD23/IgE, CD25, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD41, CD44, CD51, CD52, CD62L, CD74, CD80, CD125, CD147/basigina, CD152/CTLA-4, CD154/CD40L, CD195/CCR5, CD319/SLAMF7).

Los anticuerpos comerciales correspondientes que se pueden usar para reconocer una molécula endógena de la superficie celular modificada o truncada incluyen, pero no se limitan a, 3F8, abagovomab, abciximab, adecatumumab, afutuzumab, alemtuzumab, altumomab pentetato, anatumomab mafenatox, apolizumab, arcitumomab, aselizumab, atlizumab (= tocilizumab), basiliximab, bectumomab, benralizumab, besilesomab, bivatuzumab mertansina, blinatumomab, brentuximab vedotina, cantuzumab mertansina, capromab pendetida, catumaxomab, CC49, cedelizumab, celmoleukin, citatuzumab bogatox, clenoliximab, clivatuzumab tetraxetano, CNTO-95, conatumumab, dacetuzumab, daclizumab, daratumumab, detumomab, ecomeximab, edrecolomab, efalizumab, elotuzumab, enlimomab pegol, epitumomab cituxetano, epratuzumab, erlizumab, etaracizumab, fanolesomab, faralimomab, farletuzumab, galiximab, gavilimomab, gemtuzumab ozogamicina, glembatumumab vedotina, gomiliximab, ibalizumab, ibritumomab tiuxetano, igovomab, intetumumab, iratumumab, inolimomab, inotuzumab ozogamicina, ipilimumab, keliximab, labetuzumab, lintuzumab, lexatumumab, lucatumumab, lumiliximab, mapatumumab, maslimomab, milatuzumab, minretumomab, mitumomab, muromonab-CD3, naptumomab estafenatox, natalizumab, ocrelizumab, odulimomab, ofatumumab, olaratumab, oportuzumab monatox, oregovomab, orelizumab, pentumomab, priliximab, PRO 140, rituximab, rovelizumab, ruplizumab, satumomab pendetida, siplizumab, sontuzumab, tadocizumab, taplitumomab paptox, teneliximab, teplizumab, TGN1412, ticilimumab (= tremelimumab), tigatuzumab, tocilizumab (= atlizumab), toralizumab, tositumomab, tremelimumab, tucotuzumab, vedolizumab, veltuzumab, visilizumab, vitaxin, volociximab, votumumab, zanolimumab, ziralimumab, zolimomab aritox.

La molécula endógena de superficie celular modificada puede codificarse por un gen del receptor de tirosina quinasa modificado o truncado. Los ejemplos de receptores de tirosina quinasa que se pueden modificar o truncar de acuerdo con las realizaciones descritas en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, miembros de la familia del receptor del factor de crecimiento endotelial (EGFR/ErbB1/HER1; ErbB2/HER2/neu; ErbB3/HER3; ErbB4/HER4), el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGFR/c-MET) y el receptor-1 del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1R). De acuerdo con algunas realizaciones, los receptores de tirosina quinasa modificados retienen un epítipo extracelular reconocido por un anticuerpo conocido o fragmento funcional del mismo, y carecen de al menos un dominio de tirosina quinasa. Un receptor de tirosina quinasa modificado que carece de al menos un dominio de tirosina quinasa hace que el receptor sea inerte.

Los anticuerpos comerciales que se pueden usar para reconocer un receptor de tirosina quinasa modificado incluyen, pero no se limitan a AMG-102, AMG-479, B1B022OA-5D5, CP-751,871, IMC-A12, R1507, cetuximab, cixutumumab, ertumaxomab, figitumumab, matuzumab, necitumumab, panitumumab, pertuzumab, nimotuzumab, robatumumab, trastuzumab, zalutumumab.

En una realización, la molécula de superficie celular endógena modificada es un EGFR truncado (EGFRt). El EGFRt carece del Dominio I, el Dominio II, el Dominio de Yuxtamembrana y el Dominio tirosina quinasa en comparación con un EGFR no modificado (Figura 1).

Un gen que codifica una molécula de superficie celular endógena modificada puede usarse como un marcador de selección o enriquecimiento de células para una población modificada genéticamente de células inmunes (por ejemplo, células T). El gen que codifica una molécula de superficie celular endógena modificada se puede acoplar a un gen que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) dirigido a tumor. Estos genes pueden insertarse en un vector para transducir la población de células T para ser modificadas genéticamente. Después de la transducción, las células que se transducen exitosamente y expresan el CAR y la molécula endógena de la superficie celular modificada se enriquecen con cualquier método de purificación adecuado, tal como la purificación inmunomagnética con microperlas anti-biotina o anti-biotina conjugada con fluorocromo para la clasificación de células activadas por fluorescencia, utilizando un anticuerpo comercial que reconoce la molécula endógena de la superficie celular modificada expresada por la célula transducida.

En otra realización, un gen que codifica un receptor del factor de crecimiento epidérmico humano truncado (EGFRt) que carece del dominio de unión al EGF distal de membrana y la cola de señalización citoplasmática, pero retiene el epítipo proximal de la membrana extracelular reconocido por el anticuerpo monoclonal anti-EGFR (mAb) cetuximab aprobado por la FDA u otro anticuerpo anti-EGFR, se construye como se describe en este documento. El EGFRt se puede acoplar con receptores de antígenos quiméricos específicos para un antígeno asociado a un tumor. El antígeno asociado a tumor puede ser CD19, CD20 o CD22, o cualquier otro antígeno asociado a tumor, pero es preferiblemente

CD19 (CD19CAR). El antígeno asociado al tumor es seguido por un enlazador escindible 2A del terminal C y la secuencia de codificación para EGFRt. El cetuximab biotinilado se puede usar junto con microperlas de anti-biotina disponibles comercialmente para el propósito de purificación inmunomagnética del antígeno asociado al tumor/transductores que expresan CAR. En el caso de que el antígeno asociado a tumor sea CD19, el producto son transductores que expresan CD19CAR. Alternativamente, el cetuximab biotinilado se puede usar junto con anti-biotina conjugada con fluorocromo para la clasificación de células activadas por fluorescencia.

En otra realización, se puede usar una molécula endógena de la superficie celular modificada como un marcador para el injerto de células T *in vivo*. Por ejemplo, cuando la molécula endógena de la superficie celular modificada es EGFRt, el EGFRt se puede usar para seguir la captación de las células T a las que está adherido *in vivo*, sin afectar la función celular de las células T o las células a las que se dirigen las células T, tal como las células de médula ósea en una situación de trasplante. El uso de cetuximab conjugado con sondas o genes informadores, tal como sr39TK, se puede usar para mejorar el potencial de seguimiento de células que expresan EGFRt a pacientes a través de técnicas de formación de imágenes PET.

En una realización separada, se puede usar una molécula endógena de superficie celular modificada para inducir el suicidio celular. Por ejemplo, EGFRt se puede usar como un gen suicida a través del complemento mediado por cetuximab y/o las vías de citotoxicidad mediadas por células dependientes de anticuerpos (ADCC). El hecho de que el cetuximab sea un anticuerpo terapéutico aprobado por la FDA facilita aún más el potencial del gen suicida de EGFRt en el entorno clínico.

En otras realizaciones, el epítipo de selección del receptor del factor de crecimiento epidérmico truncado (EGFRt) u otra molécula de superficie celular modificada se une a otras secuencias. Un ejemplo de secuencia es la secuencia señal de cadena alfa GMCSFR, que dirige la expresión de superficie, unida a EGFRt. GMCSFR está codificado por los nucleótidos 1-66 y EGFRt está codificado por los nucleótidos 67-1071 de la SEQ ID NO: 1. Véase la Figura 7. También en la Figura 7 se encuentran las secuencias de cadena antisentido (SEQ ID NO: 2) y de aminoácido (SEQ ID NO: 3) de la secuencia señal de la cadena alfa de GMCSFR unida a EGFRt. Otra secuencia de este tipo es una secuencia de ADNc con codones optimizados que codifica un receptor de antígeno quimérico coestimulador anti-CD19 (CD19R-CD28gg-Zeta(CO)), y un enlazador T2A escindible. Los linfocitos T citotóxicos (CTL) modificados para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) específico para CD19 que envía señales a través de un dominio coestimulador citoplasmático (CD28) fusionado al dominio CD3- ζ citoplasmático muestra una potencia antitumoral superior que puede atribuirse a la supervivencia mediada por CD28y la producción de citoquinas mejorada. Este constructo puede modificarse aún más para incorporar un enlazador escindible 2A en el terminal C seguido por la secuencia de codificación para un EGFR humano truncado (EGFRt) con el fin de purificación inmunomagnética de transductores que expresan CAR usando microperlas de cetuximab-biotina/antibiotina. Véase la secuencia de CD19R-CD28gg-Zeta(CO)-T2A-EGFRt unida como en la Figura 8, SEQ ID NOs: 4 (cadena sentido de nucleótidos), 5 (cadena antisentido de nucleótidos) y 6 (proteína). La transducción con lentivector de células T humanas primarias con este ADNc con codón optimizado dirige la expresión coordinada del CAR y EGFRt (Figura 9).

Para eliminar la variabilidad entre productos de expresión transgénica, ya sea intrínsecos a los procedimientos de transducción sin selección subsiguiente, se desarrolló un epítipo de selección no inmunogénico, EGFRt, compatible con selección inmunomagnética utilizando el dispositivo CliniMACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Por ejemplo, EGFRt es un receptor del factor de crecimiento epidérmico humano truncado que carece del dominio de unión a EGF distal de la membrana y la cola de señalización ectoplasmática, pero retiene el epítipo proximal de la membrana extracelular reconocido por el mAb comercial anti-EGFR cetuximab. Véase la Figura 1. Cetuximab biotinilado se aplica a la selección inmunomagnética en combinación con microperlas anti-biotina (Miltenyi). Los blastos de OKT3 humanos que se habían transducido de forma lentiviral con CD19R-CD28gg-Zeta(CO)-T2A-EGFRt se sometieron a selección inmunomagnética utilizando el dispositivo Miltenyi AutoMACS, y la frecuencia de células T EGFRt⁺CAR⁺ se enriqueció desde el 22% (selección previa) hasta el 99% (selección posterior) sin toxicidad observable para la preparación de células (Figura 3). También es posible que, en lugar de o además de clasificación inmunomagnética, el EGFRt se pueda purificar utilizando técnicas de clasificación de células con base en fluorescencia.

Debido a la ausencia de los dominios de unión a EGF y los dominios de señalización intracelular, el EGFRt es inactivo cuando se expresa por las células T. Es importante destacar que las células T seleccionadas con EGFRt mantienen su fenotipo efector deseado, incluida la actividad citotóxica antitumoral mediada por el receptor de antígeno quimérico que se expresa de manera coordinada con el EGFRt, y siguen siendo susceptibles a los protocolos de expansión establecidos.

En general, este EGFRt tiene varias ventajas para los productos celulares inmunoterapéuticos en comparación con otros marcadores de selección que se han informado previamente. Específicamente, a diferencia de los CD4 y CD19 truncados, no se expresa de manera endógena por las subpoblaciones de linfocitos. Además, en contraste con el CD34 truncado y el receptor del factor de crecimiento nervioso de baja afinidad, no tiene ninguna actividad que pueda afectar negativamente al producto de las células inmunitarias (es decir, en términos de señalización o tráfico). Por último, solo puede ser unido/reconocido por un reactivo de anticuerpo de grado farmacéutico conocido, preferiblemente comercialmente disponible, es decir, cetuximab. Juntos, estos atributos hacen del EGFRt un marcador de selección

superior para cualquier sistema de transfección/transducción que se pueda aplicar a la generación de productos celulares para la inmunoterapia adoptiva. Por lo tanto, EGFRt es muy adecuado para ser utilizado como un marcador de selección para células T transducidas de forma lentiviral de importancia inmunoterapéutica.

También se proporcionan métodos para identificar nuevos productos celulares terapéuticos que tienen los siguientes criterios: una molécula de superficie celular endógena modificada, ligando o un receptor que, como se modifica, no se expresa de forma endógena en el sujeto en el que se pretende utilizar terapéuticamente, no tiene ninguna actividad inmune u otra actividad funcional que pueda impedir el funcionamiento del producto o del sujeto en el que se administra el producto, y que puede ser reconocido por un anticuerpo conocido.

Los ejemplos se exponen para ayudar a comprender la invención pero no pretenden, y no deben interpretarse como limitantes de su alcance de ninguna manera. Los ejemplos no incluyen descripciones detalladas de métodos convencionales. Tales métodos son bien conocidos por los expertos en la técnica y se describen en numerosas publicaciones.

Ejemplo 1: Generación del EGFRt y selección inmunomagnética de células T que expresan EGFRt

Materiales y métodos

Anticuerpos y citometría de flujo

Los controles de isotipo conjugados con FITC, PE y PerCP, anti-CD8 conjugados con PerCP, anti-CD4 conjugados con FITC, anti-IFN γ conjugado con PE, anti-CD45 conjugado con PerCP y estreptavidina conjugada con PE se obtuvieron de BD Biosciences (San Jose, CA). El anti-Fc biotinilado se adquirió a través de Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. (Westgrove, PA). Anti-biotina conjugada con PE se adquirió a través de Miltenyi Biotec (Auburn, CA). EGF biotinilado se adquirió a través de Molecular Probes® Invitrogen (Carlsbad, CA). Anti-EGFR conjugado con PE se adquirió a través de Abcam Inc. (Cambridge, MA). Todos los anticuerpos y biotina-EGF se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La adquisición de datos de citometría de flujo se realizó en un FACScalibur (BD Biosciences), y el porcentaje de células en una región de análisis se calculó utilizando FCS Express V3 (De Novo Software, Los Angeles, CA).

Para la generación de cetuximab biotinilado, se intercambió el regulador de 200 mg de cetuximab (Erbix®) (19 horas) por PBS (D-PBS, pH 7,5 $\pm$ 0,1) utilizando un cartucho MidGee Hoop (UFP-30-E-H42LA) con 527 mL. El material con 2 mg/mL se modificó luego en una proporción de 20:1 utilizando Sulfo-NHS-LC-Biotina en una reacción que se llevó a cabo durante 1 hora a temperatura ambiente y luego se diafiltró para eliminar el exceso de biotina. Se intercambió el regulador de 200 mg de cetuximab biotinilado (18 horas) por PBS (D-PBS, pH 7,5 $\pm$ 0,1) utilizando un cartucho MidGee Hoop (UFP-30-E-H42LA) con 533 mL. Se añadió glicerol hasta una concentración final del 20% y luego el material se congeló en viales.

Líneas celulares

A menos que se indique lo contrario, todas las líneas celulares se mantuvieron en RPMI 1640 (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) suplementado con L-glutamina 2 mM (Irvine Scientific), ácido -2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etanosulfónico 25 mM (HEPES, Irvine Scientific), 100 U/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomycin (Irvine Scientific) y suero fetal de ternera al 10% inactivado por calor (FCS, Hyclone, Logan, UT), en lo sucesivo denominado como medio de cultivo (CM).

Para generar células T, se aislaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) mediante centrifugación en gradiente de densidad sobre Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) a partir de sangre periférica heparinizada obtenida de donantes sanos que dieron su consentimiento que participan en un Protocolo aprobado por la Junta de Revisión Interna del Centro Médico Nacional City of Hope. Para la generación de la Línea A, se estimularon PBMC lavadas con 25 U/mL de IL-2 y una relación 1:1 (célula: perla) de Dynabeads® Human T expander CD3/CD28 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Para la generación de otras líneas, se agotaron primero las PBMC lavadas con autoMACS^{MR} usando perlas anti-CD45RA (Miltenyi Biotec) de acuerdo con el protocolo del fabricante, y en algunos casos también se agotaron con anti-CD4 conjugado con PE (BD Biosciences) con perlas anti-PE (Miltenyi Biotec). Las células resultantes se sometieron luego a la selección positiva con autoMACS^{MR} utilizando DREG56 biotinilado (anti-CD62L) y perlas de anti-biotina (Miltenyi Biotec) para producir T_{CM} CD62L⁺CD45RO⁺ purificado. Las células CD8⁺ se seleccionaron adicionalmente en algunos casos utilizando AutoMACS^{MR} (Miltenyi Biotec) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se generaron células específicas para CMV mediante la estimulación de células T con 5 U/mL de rIL-2 (Chiron, Emeryville, CA) y células presentadoras de antígeno viral irradiadas autólogas en una proporción de 4:1 (respondedor: estimulador) una vez a la semana durante tres semanas, usando suero humano al 10% en lugar de FCS para evitar la estimulación no específica. Las células presentadoras de antígeno viral se derivaron de PBMC que se habían modificado genéticamente para expresar el antígeno CMVpp65.

Las PBMC se resuspendieron en solución de nucleofección utilizando el kit nucleofector de células T humanas (Amaxa Inc., Gaithersburg, MD), y se dividieron en partes alícuotas de 5 x 10⁷ células en cubetas de 0,2 cm que contenían 10

µg de HygroR-pp65_pEK (o pmaxGFP de Amaxa Inc., como control de transfección) en un volumen final de 100 µL/cubeta, y se sometió a electroporación usando el Nucleofector I de Amaxa (Amaxa Inc.), programa U-14, después de lo cual se les permitió a las células recuperarse durante 6 horas a 37°C. antes de la irradiación γ (1200 cGy).

Los constructos lentivirales de CD19CAR-T2A-EGFRt_epHIV7 (pJ02104) y CD19CAR-T2A-EGFRt-T2A-IMP2H2dm_epHIV7 (pJ02111) contienen a) las secuencias del receptor del antígeno quimérico (CAR) que consisten en los segmentos del génicos V_H y V_L del mAb, FnC63 específico de CD19, una bisagra C_{H2}-C_{H3} de IgG1, los dominios de señalización transmembrana y citoplasmáticos de la molécula CD28 coestimuladora, y el dominio citoplasmático de la cadena CD3ζ [10]; b) la secuencia T2A de autoescisión [11]; c) la secuencia de EGFR truncada (Véase Figura 1); y d) el doble mutante IMP2H2 que confiere resistencia a MPA, como se indicó. Se llevó a cabo la transducción lentiviral en células T que fueron estimuladas ya sea con 30 ng/mL de anti-CD3ε (OKT3; Ortho Biotech, Raritan, NJ) (es decir, para la Línea A) o con perlas CD3/CD28 Dynal humanas en una proporción 1:10 (es decir, para las líneas B, C, D y E) y 25 U de IL2/mL. Las células se cultivaron durante hasta 2 horas a 37°C en placas recubiertas con RetroNectin® (50 µg/mL) antes de la adición del lentivirus a un MOI de 3 y 5 µg/mL de polibreno. Después de 4 horas, se añadió medio caliente para triplicar su volumen, y luego las células se lavaron y se sembraron en placas en medio fresco después de 48 horas. Se llevó a cabo la clasificación con AutoMACS^{MR} de células que expresan EGFRt con cetuximab biotinilado y microperlas anti-biotina (Miltenyi Biotec) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La expansión de las células T en medio de expansión rápida (REM) implicó la incubación de 10⁶ células T con 30 ng/mL de anti-CD3ε (OKT3; Ortho Biotech, Raritan, NJ), 5 x 10⁷ PBMC irradiadas con rayos gamma (3.500 cGy) y 10⁷ LCL irradiados con γ (8.000 cGy) en 50 mL de CM; con la adición de 50 U/mL de rhlL-2 y 10 ng/mL de rhlL-15 (CellGenix) cada 48 horas, a partir del día 1. Las células T se volvieron a estimular de esta manera cada 14 días.

Las líneas celulares linfoblastoides transformadas con EBV (LCL) se elaboraron a partir de PBMC como se describió previamente [13]. Las células LCL-OKT3 se generaron resuspendiendo LCL en solución de nucleofección utilizando el kit Nucleofector T de Amaxa, agregando el plásmido OKT3-2A-Higromicina_pEK (pJ01609) a razón de 5 µg/10⁷ células, y se electroporaron las células utilizando el Nucleofector I de Amaxa, programa T-20. Se cultivaron las LCL OKT3-2A-Hygro_pEK resultantes (cJ03987) en CM que contenía 0,4 mg/mL de higromicina. La línea de mieloma de ratón NS0 (obsequio de Andrew Raubitschek, Centro Médico Nacional City of Hope, Duarte, CA) se resuspendió en solución de nucleofección utilizando el kit Nucleofector T (Amaxa Inc., Gaithersburg, MD), se añadió el plásmido CD19t-DHFRdm-2A-IL12_pEK (pJ01607) o GFP-IMP2H2dm-2A-IL15_pcDNA3.1(+) (pJ01043) a razón de 5 µg/5 x 10⁶ células, y las células se sometieron a electroporación utilizando el Nucleofector I de Amaxa, programa T-27. Se cultivaron NS0-CD19t-DHFRdm-2A-IL12_pEK (cJ03935) y NS0-GFP:IMP2H2-IL15(IL2ss)_pcDNA3.1(+) (cJ02096) resultantes en DMEM (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) suplementadas con FCS al 10% inactivado por calor, HEPES 25 mM y L-glutamina 2 mM en presencia ya sea de metotrexato 0,05 µM (MTX) o ácido micofenólico 6 µM (MPA). La cepa tumorigénica de U251, denominada U251T, fue un amable obsequio del Dr. Waldemar Debinski (Wake Forest, NC). Se generaron U251T-pp65 mediante transducción lentiviral de U251T con pp65-2A-eGFP-ffluc_epHIV7 (pJ01928) a un MOI de 1. La U251T-pp65-2A-eGFP-ffluc_epHIV7 resultante se clasificó por FACS para la población GFP⁺ (cJ05058). La línea de linfoma Daudi se adquirió a través de ATCC y se cultivó en medios que consiste en RPMI 1640 (Irvine Scientific), L-glutamina 2 mM (Irvine Scientific), FCS al 10% inactivado por calor (Hyclone). Se adquirieron células de leucemia linfoblástica aguda SupB15 y células de carcinoma epidermoide A431 a través de ATCC.

Análisis de proteínas

Se lisaron células (hasta 10⁷ con 80 µL de regulador de lisis, Triton-X al 1% que contenía el cóctel II inhibidor de fosfatasa (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) (1:20 de inhibidor con respecto al regulador en volumen). Se cargaron 50 µg de proteína en cada carril, y se examinaron transferencias de Western con anticuerpos del kit muestreador de anticuerpos del receptor Phospho-EGF (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA) seguido por anticuerpos anti-conejo de cabra (LI-COR, Lincoln, NE) conjugados con IRDye^{MR} 680CW o 800CW, así como el anticuerpo anti-beta-actina (LI-COR) conjugado con IRDye^{MR} 800 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se tomaron imágenes de las transferencias en el sistema de formación de imágenes infrarrojas Odyssey (LI-COR).

Ensayos de liberación de cromo

La actividad citolítica de las células T se determinó mediante un ensayo de liberación de cromo (CRA) de 4 horas, donde las células efectoras se sembraron en pozos por triplicado de microplacas de 96 pozos con fondo en V que contienen 5x10³ células T objetivo marcadas con ⁵¹Cr (Na₂⁵¹CrO₄; (5 mCi/mL); Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ) en diversas relaciones E:T en 200 µL de CM e incubadas durante 4 horas con 5% de CO₂, 37°C. Las placas se centrifugaron y se removieron 100 µL de sobrenadante de cada pozo para evaluar la liberación de cromo utilizando un contador γ (Packard Cobra II, Downer's Grove, IL). El porcentaje específico de lisis se calculó de la siguiente manera: 100 x (liberación experimental - liberación espontánea)/(liberación máxima - liberación espontánea). La liberación máxima se determinó midiendo el contenido de ⁵¹Cr de los pozos que contenían objetivos etiquetados lisados con SDS al 2%.

La citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos se determinó mediante la liberación de cromo como se indicó anteriormente utilizando 5x10³ células T objetivo marcadas con ⁵¹Cr que se habían preincubado durante 90

minutos con hasta 10 µg/mL de cetuximab o rituximab (un mAb específico de CD20), se lavaron y luego se incubaron conjuntamente con 5x10⁵ PBMC recién aisladas.

Injerto de células T y suicidio mediado por cetuximab *in vivo*

Para el injerto de células T, se inyectaron ratones NOD/ScidIL-2RyC^{null} de seis a diez semanas de edad en forma i.v. en el día 0 con 10⁷ células T (línea C). Se administran 2x10⁷ células irradiadas NS0-GFP:IMPDH2-IL15 (IL2ss)_pcDNA3.1(+) (cJ02096) irradiadas (8000 rads) en forma i.p. 3 veces a la semana a partir del día 0 para proporcionar un suministro sistémico de IL-15 *in vivo*. Se extrajo médula ósea de animales sacrificados y se analizó mediante citometría de flujo. Se realizan ensayos de citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos para determinar la actividad de cetuximab contra células T EGFRt⁺.

Resultados

Selección inmunomagnética de células T que expresan EGFRt

Se generó un EGFR humano truncado (EGFRt), que contiene solo el dominio transmembrana y los dominios extracelulares III y IV del EGFR de longitud completa, como un epítipo de selección no inmunogénico compatible con la selección inmunomagnética. Como se muestra en el modelo molecular de la Figura 1, el EGFRt conserva la capacidad de unirse a cetuximab, pero no tiene ninguna capacidad de señalización debido a la ausencia de los dominios intracelulares. Además, carece del dominio del terminal N requerido para la unión a EGF.

Para seleccionar inmunomagnéticamente las células que expresan EGFRt, se generó cetuximab biotinilado (Figura 2a, b) que se usa junto con microperlas anti-biotina comercialmente disponibles y un separador AutoMACS^{MR} (Miltenyi Biotec) (Figura 2c). La transducción lentiviral de varias líneas de células T con constructos que contienen EGFRt, donde el gen del EGFRt se separó de otros genes de interés en uno o ambos extremos con la secuencia T2A de autoescisión, dio como resultado la detección en la superficie de la molécula EGFRt en menos del 40% de las células (Figura 2d). La detección en la superficie también se puede lograr con una fusión EGFRt-sr39TK. La selección inmunomagnética permitió la recuperación de poblaciones de células T EGFRt⁺ con una pureza superior al 90%. Las poblaciones de células T que se sometieron a este procedimiento de transducción y selección incluyeron blastos de células T estimulados con perlas anti-CD3/anti-CD28 (para la línea A), las células T derivadas de memoria central (T_{CM} CD45RO⁺CD62L⁺) (para las líneas B, C y E), que en algunos casos también fueron preseleccionados para la especificidad de CMV (a través del TCR endógeno; para la Línea B) o la expresión de CD8 (para la Línea C), así como células T derivadas de la memoria efectora (T_{EM} CD62L⁻CD45RO⁺) (para la línea D). Estos datos muestran que EGFRt se puede usar con éxito como un marcador de selección para varias fuentes de transductores de células T, incluso cuando la eficiencia de la transducción original fue tan baja como un 2%.

Inactividad del EGFRt en células T seleccionadas

Para confirmar que EGFRt es inactivo, se llevaron a cabo análisis de inmunotransferencia Western para fosforilación del EGFR en las células T seleccionadas con EGFRt después de cultivo con EGF o cetuximab. Como se esperaba, cetuximab no indujo fosforilación del EGFR por encima del fondo, incluso en la línea celular A431 EGFR⁺ (Figura 3a). Además, a diferencia de lo que se observa con las células A431, no se observó fosforilación en lisados de la Línea A después de incubación conjunta con EGF. En realidad, al utilizar EGF biotinilado, el análisis de citometría de flujo confirmó que EGF no puede unirse a células T seleccionadas con EGFRt (Figura 3b), como se esperaba debido al truncamiento en su extremo terminal N. Estas células T EGFRt⁺ tampoco fueron reconocidas por otro anticuerpo anti-EGFR distinto de cetuximab.

Mantenimiento del fenotipo efector en células T EGFRt⁺CD19CAR⁺ expandidas

Directamente después de la separación de AutoMACS^{MR}, las células T seleccionadas se expandieron 30 veces o más dentro de los 12 días posteriores a la estimulación con REM con OKT3, alimentadores de PBMC irradiados y LCL, IL-2 e IL-15 (Figura 4a). El análisis de citometría de flujo de las células T EGFRt⁺ expandidas resultantes confirmó además que expresan los marcadores de células T y CD19CAR, tales como CD8, TCR, CD3, perforina, granzima, etc. (Figura 4b). Además, la actividad citotóxica dirigida por CD19CAR de estas líneas seleccionadas por EGFRt es evidente en los ensayos de liberación de cromo que utilizan objetivos tumorales que expresan CD19 (Figura 4c). Una comparación directa de la reactividad específica de CD19 de la Línea E frente a sus contrapartes no seleccionada o "parental" muestra que existe citotoxicidad mejorada mediada por CD19CAR tras la selección con EGFRt. Además, las células de la Línea B CD19CAR⁺EGFRt⁺ derivadas de T_{CM} específicas de CMV también muestran actividad citotóxica a través de su receptor de células T endógeno contra objetivos que expresan antígeno CMV-pp65.

Para la línea E de CD19CAR⁺EGFRt⁺IMPDH2dm⁺, la capacidad del mutante doble de inosina monofosfato deshidrogenasa 2 (IMPDH2dm) para conferir resistencia al ácido micofenólico inhibidor de IMPDH2 (MPA; un inmunosupresor común utilizado para prevenir el rechazo en el trasplante de órganos) también fue probado. Tras el cultivo en MPA 1 µM, la supervivencia y/o proliferación de células de Línea E no se inhibe (Figura 4d). Esto contrasta con la inhibición observada con una línea de células T de control que carece de expresión del gen de IMPDH2dn.

Estos datos proporcionan evidencia adicional de que la selección mediada por EGFRt da como resultado la correspondiente la selección de los otros genes presentes en el constructo lentiviral utilizado para transducir células T.

5 Seguimiento de células T EGFRt⁺ *in vivo*

Para probar el potencial para detectar células T injertadas *in vivo*, se analizaron las células de médula ósea recolectadas de ratones que se habían injertado con la Línea C CD19CAR⁺EGFRt⁺ mediante citometría de flujo utilizando cetuximab biotinilado (Figura 5). Los ratones de control que no recibieron células T revelaron que hubo alguna reacción cruzada del cetuximab contra EGFR murino. Por lo tanto, se determinó que la detección exitosa de células de Línea C injertadas requería doble tinción tanto para CD45 humano como para EGFRt. Las células también pueden analizarse utilizando inmunohistoquímica para determinar el potencial para seleccionar material de biopsia.

Citotoxicidad mediada por cetuximab de células T EGFRt⁺

Debido a que se sabe que cetuximab lisan las células que expresan EGFR a través de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC), se realizaron ensayos para determinar la actividad de ADCC de cetuximab contra las células T EGFRt⁺ (Figura 6). Utilizando células de Línea A marcadas con ⁵¹Cr como PBMC humanas seleccionadas y recién aisladas como efectoras, se encontró que cetuximab media significativamente la liberación de cromo por encima de lo observado cuando se usa el mAb Rituxan humanizado específico de CD20.

Ejemplo de uso terapéutico de células T EGFRt⁺

Los sujetos adultos con linfomas de células β de grado intermedio de alto riesgo que son candidatos para un procedimiento de trasplante de células madre mieloablativo autólogo pueden recibir inmunoterapia posterior al trasplante con Injertos de células T CD19R⁺CD8⁺EGFRt⁺ derivadas de Tcm autólogo transferido de forma adoptiva. Un producto de leucaféresis recolectado de cada paciente se somete a selección de Tcm, transducción con CD19CART2A-EGFRt⁺epHIV7, grado clínico y luego selección y expansión de células EGFRt⁺ en un sistema cerrado. Una vez que los productos celulares resultantes se han sometido a pruebas de control de calidad (incluidas las pruebas de esterilidad y citotoxicidad específica de tumores), se someten a crioconservación. Mientras tanto, después de la leucaféresis, los participantes del estudio comienzan con quimioterapia de rescate estándar, con movilización para la recolección automática de HSC con quimioterapia citorreductora y G-CSF. Dado que las células T específicas para CD19 seleccionadas con EGFRt también atacarán células B CD20⁺ (CD19⁺) normales, se puede disminuir primero el número de células B usando Rituximab^{MR} para reducir la respuesta inflamatoria del receptor para recibir CTL modificado genéticamente y también aumentar la disponibilidad de células T infundidas para atacar inmediatamente las células del linfoma. Además, Rituximab^{MR} puede mitigar una respuesta inmune humoral contra las células T modificadas genéticamente. Si Rituximab^{MR} no se administra como parte del régimen de quimioterapia de Salvación/Cebado, los participantes en la investigación pueden recibir una única infusión intravenosa de Rituximab^{MR} (anticuerpo anti-CD20 quimérico) con 375 mg/m² dentro de las 4 semanas del procedimiento auto-HSCT planeado. La infusión de Rituximab^{MR} se llevaría a cabo de acuerdo con la práctica estándar, incluida la medicación previa con difenhidramina y acetaminofén e hidrocortisona. El día +2 o el día +3 después de HSCT, el producto de las células T CD19R⁺ CD8⁺ criopreservado en forma autóloga se transportará, descongelará e infundirá al lado de la cama del paciente. Los participantes en la investigación pueden ser previamente medicados al menos 30 minutos antes de la infusión de células T con 15 mg/kg de acetaminofén P.O. (máximo 650 mg) y difenhidramina 0,5-1 mg/kg en forma i.v. (dosis máxima 50 mg). Los estudios clínicos y de laboratorio correlativos de seguimiento pueden realizarse luego a discreción del médico, y pueden incluir estudios de RT-PCR cuantitativa para la presencia de células de linfoma que expresan CD19 y/o células T transferidas de forma adoptiva; barridos de FDG-PET y/o CT; examen de médula ósea para evaluación patológica específica de la enfermedad; biopsia de ganglio linfático; y/o seguimiento a largo plazo de acuerdo con las pautas establecidas por el Comité Asesor de Modificadores de Respuesta Biológica de la FDA que se aplican a los estudios de transferencia de genes. La Figura 10 proporciona un posible esquema para las pruebas clínicas de los productos y métodos actuales.

La presente invención no está limitada en su alcance por las realizaciones específicas descritas en los ejemplos que se pretende que sean ilustraciones de algunos aspectos de la invención.

Referencias

- Berger, C, Flowers, ME, Warren, EH, y Riddell, SR (2006). Analysis of transgene-specific immune responses that limit the *in vivo* persistence of adoptively transferred HSV-TK-modified donor T cells after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 107: 2294-302.
- Tey, SK, Dotti, G, Rooney, CM, Heslop, HE, y Brenner, MK (2007). Inducible caspase 9 suicide gene to improve the safety of allodepleted T cells after haploidentical stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 13: 913-24.
- Fehse, B, Richters, A, Putimtseva-Scharf, K, Klump, H, Li, Z, Ostertag, W, et al. (2000). CD34 splice variant: an attractive marker for selection of gene-modified cells. *Mol Ther* 1: 448-56.
- Gaines, P, y Wojchowski, DM (1999). pIRES-CD4t, a dicistronic expression vector for MACS- or FACS-based selection of transfected cells. *Biotechniques* 26: 683-8.

5. Fehse, B, Uhde, A, Fehse, N, Eckert, HG, Clausen, J, Ruger, R, et al. (1997). Selective immunoaffinity-based enrichment of CD34+ cells transduced with retroviral vectors containing an intracytoplasmatically truncated version of the human low-affinity nerve growth factor receptor (deltaLNGFR) gene. *Hum Gene Ther* 8: 1815-24.
6. Lemoine, FM, Mesel-Lemoine, M, Cherai, M, Gallot, G, Vie, H, Leclercq, V, et al. (2004). Efficient transduction and selection of human T-lymphocytes with bicistronic Thy1/HSV1-TK retroviral vector produced by a human packaging cell line. *J Gene Med* 6: 374-86.
7. Li, S, Schmitz, KR, Jeffrey, PD, Wiltzius, JJ, Kussie, P, y Ferguson, KM (2005). Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell* 7: 301-11.
8. Dawson, JP, Berger, MB, Lin, CC, Schlessinger, J, Lemmon, MA, y Ferguson, KM (2005). Epidermal growth factor receptor dimerization and activation require ligand-induced conformational changes in the dimer interface. *Mol Cell Biol* 25: 7734-42.
9. Lange, C, Li, Z, Fang, L, Baum, C, y Fehse, B (2007). CD34 modulates the trafficking behavior of hematopoietic cells in vivo. *Stem Cells Dev* 16: 297-304.
10. Kowolik, CM, Topp, MS, Gonzalez, S, Pfeiffer, T, Olivares, S, Gonzalez, N, et al. (2006). CD28 costimulation provided through a CD19-specific chimeric antigen receptor enhances in vivo persistence and antitumor efficacy of adoptively transferred T cells. *Cancer Res* 66: 10995-1004.
11. Szymczak, AL, Workman, CJ, Wang, Y, Vignali, KM, Dilioglou, S, Vanin, EF, et al. (2004). Correction of multigene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector. *Nat Biotechnol* 22: 589-94.
12. Yam, P, Jensen, M, Akkina, R, Anderson, J, Villacres, MC, Wu, J, et al. (2006). Ex vivo selection and expansion of cells based on expression of a mutated inosine monophosphate dehydrogenase 2 after HIV vector transduction: effects on lymphocytes, monocytes, and CD34+ stem cells. *Mol Ther* 14: 236-44.
13. Pelloquin, F, Lamelin, JP, y Lenoir, GM (1986). Human B lymphocytes immortalization by Epstein-Barr virus in the presence of cyclosporin A. *In Vitro Cell Dev Biol* 22: 689-94.

Listado de secuencias

<110> JENSEN, Michael C

<120> RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO TRUNCADO (EGFRT) PARA SELECCIÓN DE CÉLULAS T TRANSDUCIDAS

<130> 54435.8070.WO00

<140> PCT/US2010/055329

<141> 2010-11-03

<150> US 61/257.567

<151> 2009-11-03

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1071

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 717 629 T3

atgcttctcc	tggtgacaag	ccttctgctc	tgtgagttac	cacacccagc	attcctcctg	60
atcccacgca	aagtgtgtaa	cggaataggt	attggtgaat	ttaaagactc	actctccata	120
aatgctacga	atattaaaca	cttcaaaaac	tgacactcca	tcagtggcga	tctccacatc	180
ctgccggtgg	catttagggg	tgactccttc	acacatactc	ctcctctgga	tccacaggaa	240
ctggatattc	tgaaaaccgt	aaaggaaatc	acaggggtttt	tgctgattca	ggcttggcct	300
gaaaacagga	cggacctcca	tgcccttgag	aacctagaaa	tcatacgcg	caggaccaag	360
caacatggtc	agttttctct	tgagtcgtc	agcctgaaca	taacatcctt	gggattacgc	420
tccctcaagg	agataagtga	tgagatgtg	ataatttcag	gaaacaaaaa	tttgtgctat	480
gcaaatacaa	taaactggaa	aaaactgttt	gggacctccg	gtcagaaaaa	caaaattata	540
agcaacagag	gtgaaaacag	ctgcaaggcc	acaggccagg	tctgccatgc	cttgtgctcc	600
cccgagggtc	gctggggccc	ggagcccagg	gactgcgtct	cttgccggaa	tgctagccga	660
ggcaggggaat	gcgtggacaa	gtgcaacctt	ctggaggggtg	agccaaggga	gtttgtggag	720
aactctgagt	gcatacagtg	ccaccagag	tgctgcctc	aggccatgaa	catcacctgc	780
acaggacggg	gaccagacaa	ctgtatccag	tgtgcccact	acattgacgg	ccccactgc	840
gtcaagacct	gcccggcagg	agtcattggga	gaaaacaaca	ccctgggtctg	gaagtacgca	900
gacgccggcc	atgtgtgcca	cctgtgccat	ccaaactgca	cctacggatg	cactgggcca	960
ggtcttgaag	gctgtccaac	gaatgggcct	aagatcccgt	ccatcgccac	tgggatgggtg	1020
ggggccctcc	tcttgctgct	ggtggtggcc	ctggggatcg	gcctcttcat	g	1071

<210> 2

<211> 1071

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 2

ES 2 717 629 T3

```
tacgaagagg accactgttc ggaagacgag acactcaatg gtgtgggtcg taaggaggac      60
taggggtgctg ttcacacatt gccttatcca taaccactta aatttctgag tgagaggatat      120
ttacgatgct tataatttgt gaagtttttg acgtggaggt agtcaccgct agagggtgtag      180
gacggccacc gtaaattccc actgaggaag tgtgtatgag gaggagacct aggtgtcctt      240
gacctataag acttttggca tttccttttag tgtcccaaaa acgactaagt ccgaaccgga      300
cttttgcct gcctggaggt acggaaactc ttggatcttt agtatgcgcc gtcctggttc      360
gttgtaccag tcaaaagaga acgtcagcag tcggacttgt attgtaggaa ccctaatacg      420
agggagtcc tctattcact acctctacac tattaaagtc ctttgttttt aaacacgata      480
cgtttatgtt atttgacctt ttttgacaaa ccctggaggc cagtcttttg gttttaatat      540
tcgttgtctc cacttttgtc gacgttccgg tgtccggtcc agacggtagc gaacacgagg      600
gggctcccga cgaccccgga cctcgggtcc ctgacgcaga gaacggcctt acagtcggct      660
ccgtccctta cgcacctgtt cacgttgga gacctccac tcggttccct caaacacctc      720
ttgagactca cgtatgtcac ggtgggtctc acggacggag tccggtactt gtagtggacg      780
tgtcctgccc ctggtctgtt gacataggct acacgggtga tgtaactgcc gggggtgacg      840
cagttctgga cgggcccgtc tcagtaccct cttttgttgt gggaccagac cttcatgcgt      900
ctgcccggcg tacacacggt ggacacggta ggtttgacgt ggatgcctac gtgacccggt      960
ccagaacttc cgacaggttg cttaccgga ttctagggca ggtagcggtg accctaccac     1020
ccccgggagg agaacgacga ccaccaccgg gaccctagc cggagaagta c              1071
```

<210> 3

<211> 357

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

```
Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly
      20          25          30
```

```
Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe
      35          40          45
```

```
Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala
      50          55          60
```

10

ES 2 717 629 T3

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

ES 2 717 629 T3

[illegible]

<210> 4
<211> 3186
<212> ADN
<213> Homo sapiens

$\langle 400 \rangle$ 4

atgctgctgc	tggtgaccag	cctgctgctg	tgcgagctgc	cccacccgc	ctttctgctg	60
atccccgaca	tccagatgac	ccagaccacc	tccagcctga	gcgccagcct	gggcgaccgg	120
gtgaccatca	gctgccgggc	cagccaggac	atcagcaagt	acctgaactg	gtatcagcag	180
aagcccgacg	gcaccgtcaa	gctgctgata	taccacacca	gccggctgca	cagcggcgtg	240
cccagccggg	ttagcggcag	cggctccggc	accgactaca	gcctgaccat	ctccaacctg	300
gaacaggaag	atatcgccac	ctacttttgc	cagcagggca	acacactgcc	ctacaccttt	360
ggcggcggaa	caaagctgga	aatcaccggc	agcacctccg	gcagcggcaa	gcctggcagc	420
ggcgagggca	gcaccaaggg	cgagggtgaag	ctgcagggaa	gcggccctgg	cctggtggcc	480
cccagccaga	gcctgagcgt	gacctgcacc	gtgagcggcg	tgagcctgcc	cgactacggc	540
gtgagctgga	tccggcagcc	ccccaggaag	ggcctggaat	ggctgggcgt	gatctggggc	600
agcgagacca	cctactacaa	cagcgccctg	aagagccggc	tgaccatcat	caaggacaac	660
agcaagagcc	aggtgtttct	gaagatgaac	agcctgcaga	ccgacgacac	cgccatctac	720
tactgcgcca	agcactacta	ctacggcggc	agctacgcca	tggactactg	gggccagggc	780
accagcgtga	ccgtgagcag	cgagagcaag	tacggccctc	cctgcccccc	ttgccctgcc	840
cccgagttcc	tgggcggacc	cagcgtgttc	ctgttcccc	ccaagcccaa	ggacaccctg	900
atgatcagcc	ggacccccga	ggtgacctgc	gtgggtggtg	acgtgagcca	ggaagatccc	960
gagggtccagt	tcaattggta	cgtggacggc	gtggaagtgc	acaacgccaa	gaccaagccc	1020
agagaggaac	agttcaacag	cacctaccgg	gtgggtgtctg	tgctgaccgt	gctgcaccag	1080
gactggctga	acggcaaaga	atacaagtgc	aagggtgtcca	acaagggcct	gcccagcagc	1140
atcgaaaaga	ccatcagcaa	ggccaagggc	cagcctcgcg	agccccaggt	gtacaccctg	1200
cctccctccc	aggaagagat	gaccaagaac	cagggtgtccc	tgacctgcct	ggtgaagggc	1260

ES 2 717 629 T3

ttctacccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaacg gccagcctga gaacaactac 1320
 aagaccaccc ctcccgtgct ggacagcgac ggcagcttct tcctgtacag ccggctgacc 1380
 gtggacaaga gccggtggca ggaaggcaac gtcttttagct gcagcgtgat gcacgaggcc 1440
 ctgcacaacc actacaccca gaagagcctg agcctgtccc tgggcaagat gttctgggtg 1500
 ctggtggtgg tgggcggggg gctggcctgc tacagcctgc tggtgacagt ggccttcac 1560
 atcttttggg tgccggagcaa gcggagcaga ggcggccaca gcgactacat gaacatgacc 1620
 cccagacggc ctggccccac ccggaagcac taccagccct acgccccacc cagggacttt 1680
 gccgcctacc ggtccggcgg agggcgggtg aagtccagca gaagcgccga cggccctgcc 1740
 taccagcagg gccagaatca gctgtacaac gagctgaacc tgggcagaag ggaagagtac 1800
 gacgtcctgg ataagcggag aggccgggac cctgagatgg gcggcaagcc tcggcggaag 1860
 aacccccagg aaggcctgta taacgaactg cagaaagaca agatggccga ggcctacagc 1920
 gagatcggca tgaagggcga gcggaggcgg ggcaagggcc acgacggcct gtatcagggc 1980
 ctgtccaccg ccaccaagga tacctacgac gccctgcaca tgcaggccct gcccccaagg 2040
 ctcgagggcg gcggagaggg cagaggaagt cttctaacat gcggtgacgt ggaggagaat 2100
 cccggcccta ggatgcttct cctggtgaca agccttctgc tctgtgagtt accacacca 2160
 gcattcctcc tgatcccacg caaagtgtgt aacggaatag gtattggtga atttaaagac 2220
 tcactctcca taaatgctac gaatattaaa cacttcaaaa actgcacctc catcagtggc 2280
 gatctccaca tcctgccggg ggcatttagg ggtgactcct tcacacatac tcctcctctg 2340
 gatccacagg aactggatat tctgaaaacc gtaaaggaaa tcacaggggt tttgctgatt 2400
 caggcttggc ctgaaaacag gacggacctc catgcctttg agaacctaga aatcatacgc 2460
 ggcaggacca agcaacatgg tcagttttct cttgcagtcg tcagcctgaa cataacatcc 2520
 ttgggattac gctccctcaa ggagataagt gatggagatg tgataatttc aggaaacaaa 2580
 aatttgctgt atgcaaatac aataaactgg aaaaaactgt ttgggacctc cggtcagaaa 2640
 accaaaatta taagcaacag aggtgaaaac agctgcaagg ccacaggcca ggtctgccat 2700
 gccttgctgt ccccgaggg ctgctggggc ccggagccca gggactgcgt ctcttgccgg 2760
 aatgtcagcc gaggcaggga atgcgtggac aagtgaacc ttctggaggg tgagccaagg 2820
 gagtttgtgg agaactctga gtgcatacag tgccaccag agtgcctgcc tcaggccatg 2880
 aacatcacct gcacaggacg gggaccagac aactgtatcc agtgtgcca ctacattgac 2940
 ggccccact gcgtcaagac ctgcccggca ggagtcattg gagaaaacaa caccctggtc 3000
 tggaagtacg cagacgccgg ccatgtgtgc cacctgtgcc atccaaactg cacctacgga 3060
 tgactgggc caggctctga aggctgtcca acgaatgggc ctaagatccc gtccatcgcc 3120
 actgggatgg tgggggccct cctcttgctg ctggtgggtg ccctggggat cggcctcttc 3180
 atgtga 3186

5 <210> 5
 <211> 3186
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 5

ES 2 717 629 T3

tacgacgacg accactgggtc ggacgacgac acgctcgacg gggtaggggacg gaaagacgac	60
taggggctgt aggtctactg ggtctggtgg aggtcggact cgcggtcgga cccgctggcc	120
cactggtagt cgacggcccc gtcggtcctg tagtcgttca tggacttgac catagtcgtc	180
ttcgggctgc cgtggcagtt cgacgactag atgggtgtggt cggccgacgt gtcgccgcac	240
gggtcggcca aatcgccgtc gccgaggccg tggctgatgt cggactggta gaggttgac	300
cttgtccttc tatagcgggt gatgaaaacg gtcgtcccgt tgtgtgacgg gatgtgaaa	360
ccgccgcctt gtttcgacct ttagtggccg tcgtggaggc cgtcgccgtt cggaccgtcg	420
ccgctcccgt cgtggttccc gctccacttc gacgtccttt cgccgggacc ggaccaccgg	480
gggtcggctc cggactcgca ctggacgtgg cactcgccgc actcggacgg gctgatgccg	540
cactcgacct aggccgtcgg ggggtccttc ccggacctta ccgaccgca ctagaccccg	600
tcgctctggt ggatgatgtt gtcgcgggac ttctcggccg actggtagta gttcctgttg	660
tcgttctcgg tccacaagga cttctacttg tcggacgtct ggctgctgtg gcggtagatg	720
atgacgcggt tcgtgatgat gatgccgccg tcgatgcggt acctgatgac cccggtcccg	780
tggtcgcact ggcactcgtc gctctcgttc atgccgggag ggacgggggg aacgggacgg	840
gggtcaagg acccgcttg gtcgcacaag gacaaggggg ggttcggggt cctgtgggac	900
tactagtcgg cctgggggct cactggacg caccaccacc tgcactcggc ctttctaggg	960
ctccaggta agttaaccat gcacctgccg caccttcacg tgttgcggtt ctgggttcggg	1020
tctctccttg tcaagttgtc gtggatggcc caccacagac acgactggca cgacgtggtc	1080
ctgaccgact tgccgtttct tatgttcacg ttccacaggt tgttcccga cgggtcgtcg	1140
tagcttttct ggtagtcgtt ccggttcccg gtcggagcgc tcgggggtcca catgtgggac	1200
ggagggaggg tccttctcta ctggttcttg gtccacaggg actggacgga ccacttcccg	1260
aagatggggt cgtgtagcg gcacctcacc ctctcgttgc cggtcggact cttgttgatg	1320
ttctgggtgg gagggcacga cctgtcgtc ccgtcgaaga aggacatgtc ggccgactgg	1380
cacctgttct cggccaccgt ctttcggtt cagaaatcga cgtcgacta cgtgctccg	1440
gacgtgttgg tgatgtgggt cttctcggac tcggacaggg acccgttcta caagaccac	1500
gaccaccacc acccgcccca cgaccggacg atgtcggacg accactgtca ccggaagtag	1560
tagaaaaccc acgcctcgtt cgctcgtct ccgcccgtgt cgtgatgta cttgtactgg	1620

ES 2 717 629 T3

```

gggtctgccg gaccggggtg ggccttcgtg atggtcggga tgcgggggtg gtcctgaaa 1680
cggcggatgg ccaggccgcc tcccgccac ttcaagtcgt cttcgcggct gcggggacgg 1740
atggtcgtcc cggcttagt cgacatgttg ctgcacttg acccgtcttc ctttctcatg 1800
ctgcaggacc tattcgctc tccggccctg ggactctacc cgccgttcgg agccgccttc 1860
ttgggggtcc ttccggacat attgcttgac gtctttctgt tctaccggct ccggatgtcg 1920
ctctagccgt acttcccgt cgctccgcc ccgttcccgg tgctgccgga catagtcccg 1980
gacagggtggc ggtggttcct atggatgctg cgggacgtgt acgtccggga cgggggttcc 2040
gagctccgc cgctctccc gtctccttca gaagattgta cgccactgca cctcctctta 2100
gggccgggat cctacgaaga ggaccactgt tcggaagacg agacactcaa tgggtgtgggt 2160
cgtaaggagg actagggtgc gtttcacaca ttgccttatc cataaccact taaatttctg 2220
agtgaagggt attacgatg cttataatth gtgaagtttt tgacgtggag gtagtcaccg 2280
ctagagggtg aggacggcca ccgtaaatcc cactgagga agtgtgtatg aggaggagac 2340
ctagggtgct ttgacctata agacttttg catttccttt agtgtccaa aaacgactaa 2400
gtccgaaccg gacttttgtc ctgcctggag gtacggaaac tcttgatct ttagtatgcy 2460
ccgtcctggt tcgttgtagc agtcaaaaga gaacgtcagc agtcggactt gtattgtagg 2520
aaccctaatt cgagggagtt cctctattca ctacctctac actattaaag tcctttgttt 2580
ttaaacacga tacgtttatg ttatttgacc ttttttgaca aaccctggag gccagtcttt 2640
tggttttaat attcgttgct tccacttttg tcgacgttcc ggtgtccggt ccagacggta 2700
cggaacacga gggggctccc gacgacccc ggcctcgggt ccctgacgca gagaacggcc 2760
ttacagtcgg ctccgtccct tacgcacctg ttcacgttgg aagacctccc actcggttcc 2820
ctcaaacacc tcttgagact cacgtatgtc acggtgggtc tcacggacgg agtccggtac 2880
ttgtagtgga cgtgtcctgc ccctggtctg ttgacatagg tcacacgggt gatgtaactg 2940
ccgggggtga cgagttctg gacgggccgt cctcagtacc ctcttttgtt gtgggaccag 3000
accttcatgc gtctgcggcc ggtacacacg gtggacacgg taggtttgac gtggatgcct 3060
acgtgacccg gtccagaact tccgacaggt tgcttaccg gattctaggg caggtagcgg 3120
tgaccctacc acccccgga ggagaacgac gaccaccacc gggacccta gccggagaag 3180
tacct 3186

```

<210> 6
 <211> 1061
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 6

5

ES 2 717 629 T3

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

ES 2 717 629 T3

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Glu Ser Lys Tyr Gly
 260 265 270
 Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
 275 280 285
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 290 295 300
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 305 310 315 320
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 325 330 335
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 340 345 350
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 355 360 365
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 370 375 380
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 385 390 395 400
 Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 405 410 415
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 420 425 430
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 435 440 445
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 450 455 460
 Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 465 470 475 480
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 485 490 495
 Met Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser
 500 505 510

ES 2 717 629 T3

Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg
 515 520 525
 Ser Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro
 530 535 540
 Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe
 545 550 555 560
 Ala Ala Tyr Arg Ser Gly Gly Gly Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala
 565 570 575
 Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu
 580 585 590
 Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly
 595 600 605
 Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu
 610 615 620
 Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser
 625 630 635 640
 Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
 645 650 655
 Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu
 660 665 670
 His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Leu Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg
 675 680 685
 Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg
 690 695 700
 Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
 705 710 715 720
 Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly
 725 730 735
 Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe
 740 745 750
 Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala

ES 2 717 629 T3

755 760 765
 Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu
 770 775 780
 Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile
 785 790 795 800
 Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu
 805 810 815
 Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala
 820 825 830
 Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu
 835 840 845
 Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr
 850 855 860
 Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys
 865 870 875 880
 Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly
 885 890 895
 Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu
 900 905 910
 Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys
 915 920 925
 Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu
 930 935 940
 Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met
 945 950 955 960
 Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala
 965 970 975
 His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val
 980 985 990
 Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His
 995 1000 1005

ES 2 717 629 T3

Val	Cys	His	Leu	Cys	His	Pro	Asn	Cys	Thr	Tyr	Gly	Cys	Thr	Gly
	1010					1015					1020			
Pro	Gly	Leu	Glu	Gly	Cys	Pro	Thr	Asn	Gly	Pro	Lys	Ile	Pro	Ser
	1025					1030					1035			
Ile	Ala	Thr	Gly	Met	Val	Gly	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Val
	1040					1045					1050			
Ala	Leu	Gly	Ile	Gly	Leu	Phe	Met							
	1055					1060								

REIVINDICACIONES

1. Un gen modificado del EGFR, que consiste en una secuencia que codifica un EGFR truncado que consiste en el dominio III del EGFR, el dominio transmembrana del EGFR y el dominio IV del EGFR.
2. El gen de la reivindicación 1, en el que el gen modificado del EGFR está unido a una secuencia de nucleótidos que codifica únicamente la secuencia señal de la cadena alfa de GMCSFR.
3. El gen de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la secuencia de aminoácidos codificada por el gen modificado del EGFR es al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO: 3.
4. El gen de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la secuencia de aminoácidos codificada por el gen modificado del EGFR consiste en la SEQ ID NO: 3.
5. Un constructo que comprende el gen de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el gen modificado del EGFR está acoplado con una secuencia de nucleótidos que codifica un receptor de antígeno quimérico específico para un antígeno asociado a tumor, en el que la secuencia de nucleótidos que codifica un receptor de antígeno quimérico es seguida por una secuencia de nucleótidos que codifica un enlazador escindible 2A del terminal C y la secuencia de codificación para el gen modificado del EGFR.
6. El constructo de la reivindicación 5, en el que el receptor del antígeno quimérico específico para un antígeno asociado a tumor se selecciona entre CD19, CD20 y CD22.
7. El constructo de la reivindicación 6, en el que el antígeno asociado a tumor es CD19.
8. El constructo de la reivindicación 5 o la reivindicación 7, en el que el constructo es CD19R-CD28gg-Zeta(CO)-T2A-EGFRt, y comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.
9. Una población genéticamente modificada de células T transducidas con el gen de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el gen está acoplado a un gen que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) dirigido a tumor, en el que las células T expresan EGFR modificado inactivo.
10. La población de células T de la reivindicación 9, en la que las células T son para uso en inmunoterapia adoptiva.
11. La población de células T para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que la inmunoterapia adoptiva es para uso en el tratamiento del cáncer.
12. Un epítipo de selección no inmunogénico codificado por el gen de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o el constructo de cualquiera de las reivindicaciones 5-8.
13. El epítipo de selección de la reivindicación 12, en el que el epítipo de selección es para uso en un uso seleccionado de:
 - (a) uso como una herramienta de selección no inmunogénica que es compatible con la selección inmunomagnética;
 - (b) uso como marcador de seguimiento para el injerto de células T *in vivo*; y
 - (c) uso como un gen suicida para células T transducidas que tienen un potencial inmunoterapéutico, opcionalmente para uso como un gen suicida a través del complemento mediado por cetuximab y/o rutas de citotoxicidad mediadas por células dependientes de anticuerpos (ADCC).
14. El epítipo de selección de la reivindicación 12, en el que el epítipo de selección es compatible con la selección inmunomagnética y facilita la inmunoterapia en pacientes con cáncer sin un rechazo inmunológico indeseable de productos celulares.

Figura 1

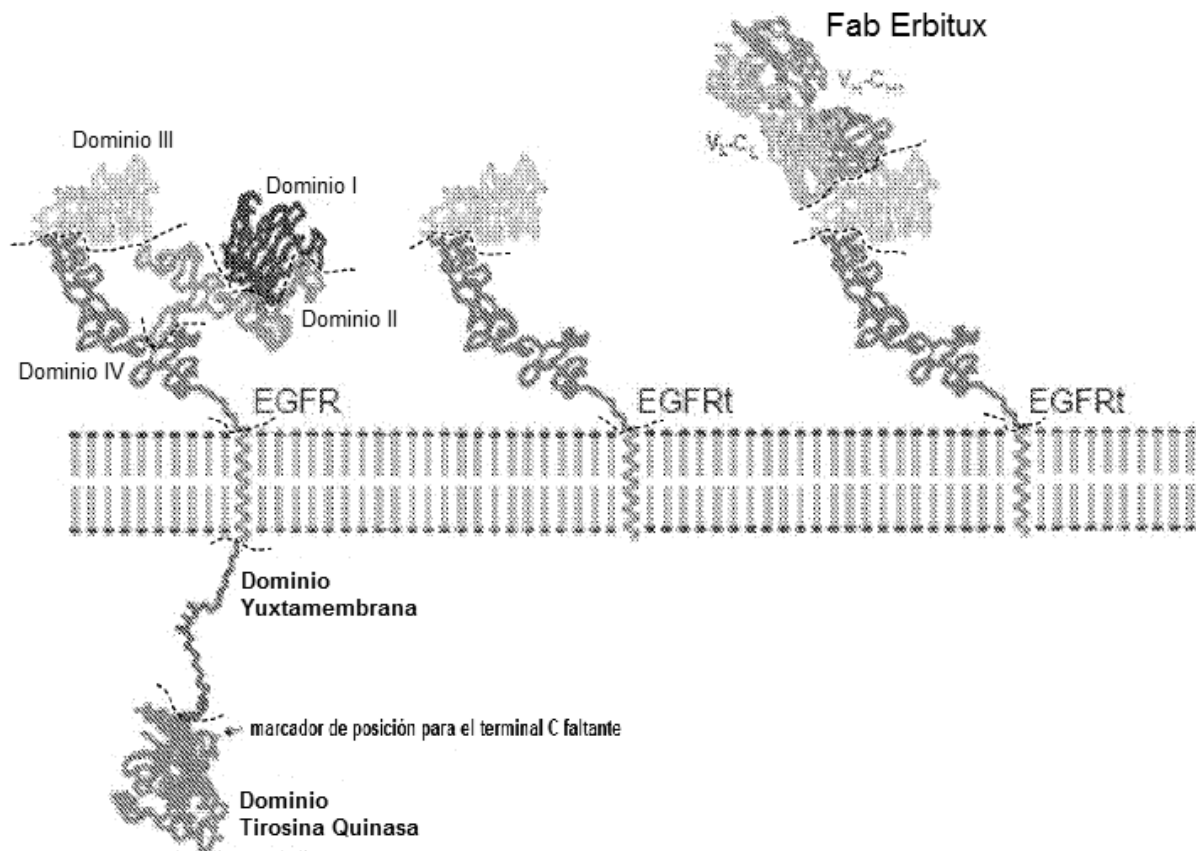


Figura 2A

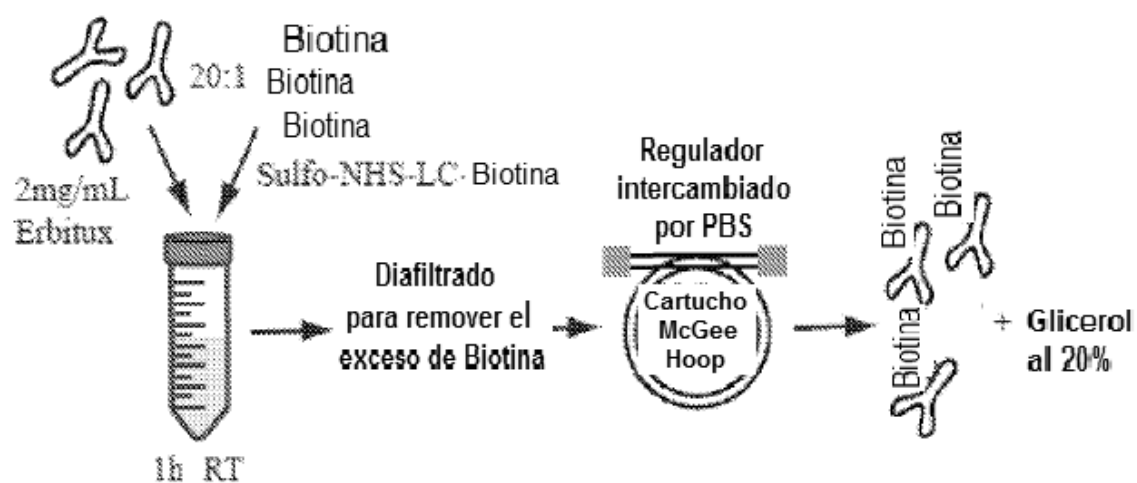


Figura 2B

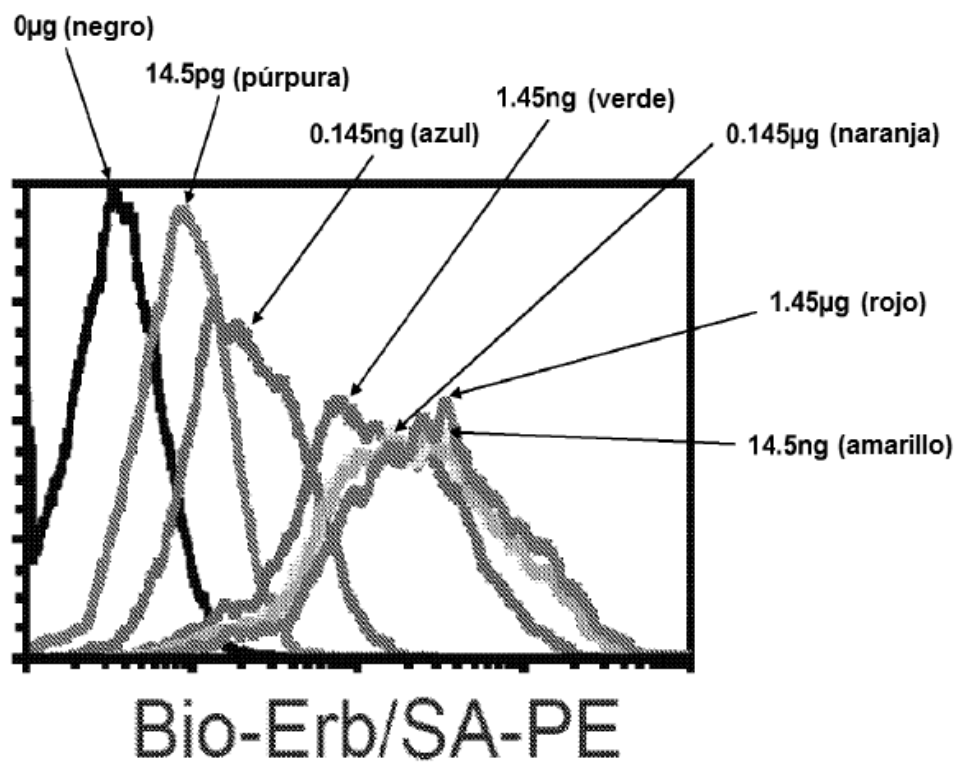


Figura 2C

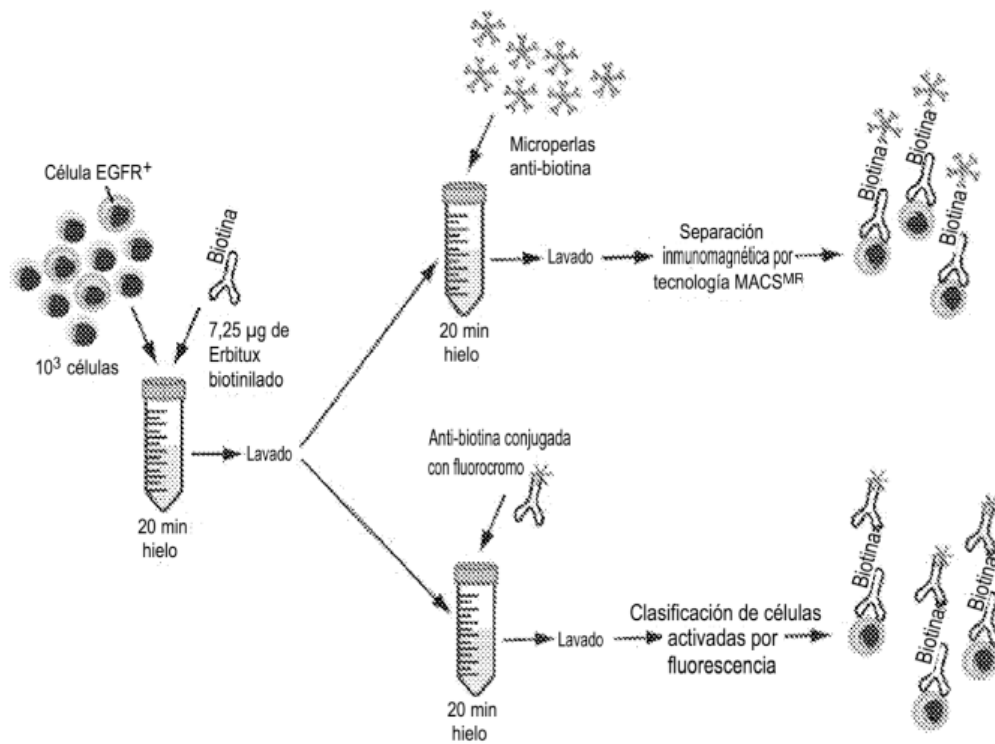


Figura 2D

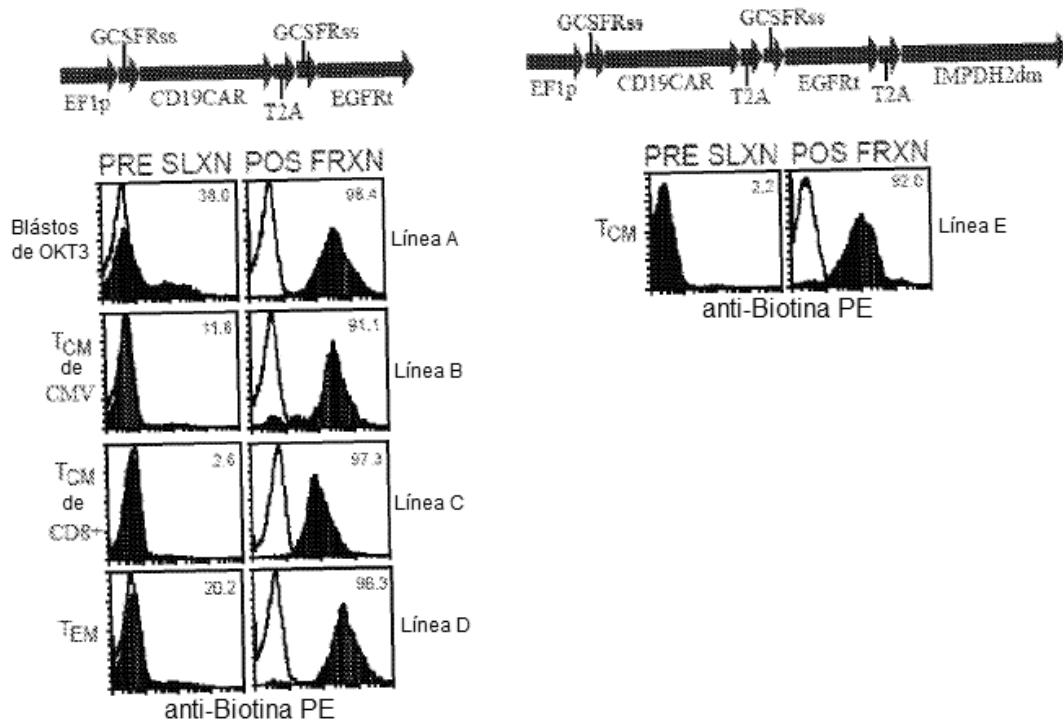


Figura 3A

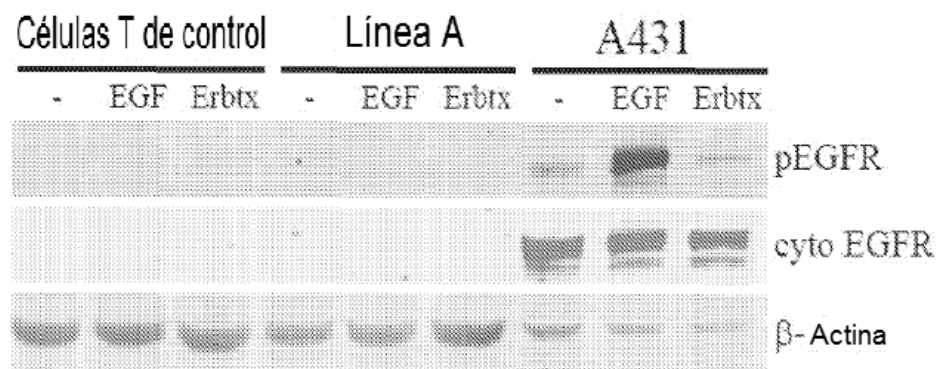


Figura 3B

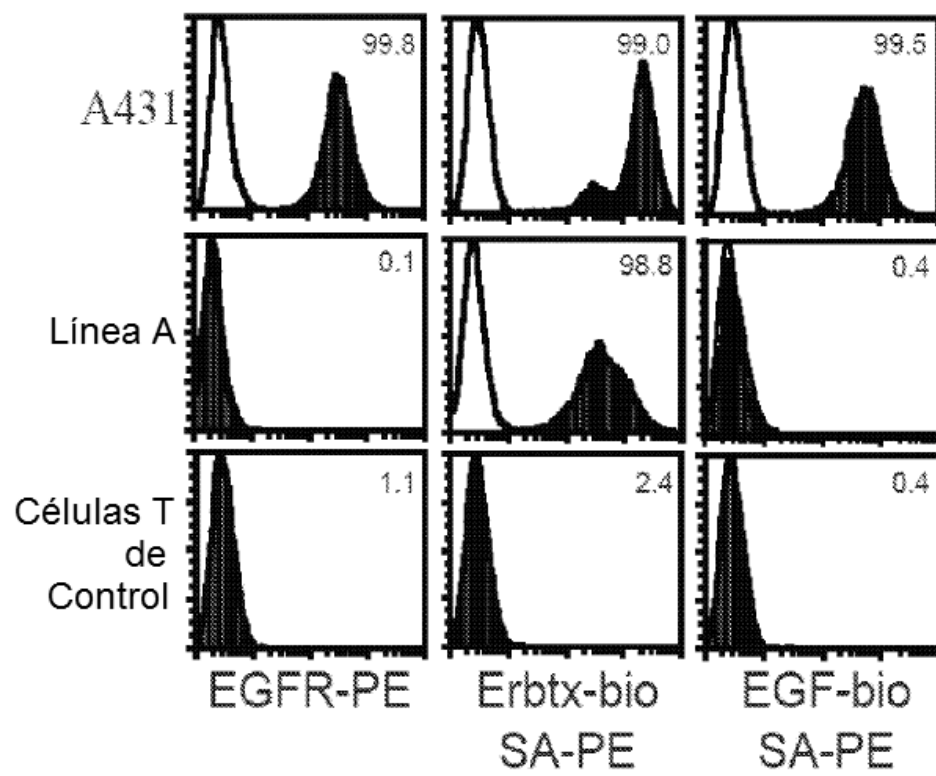


Figura 4A

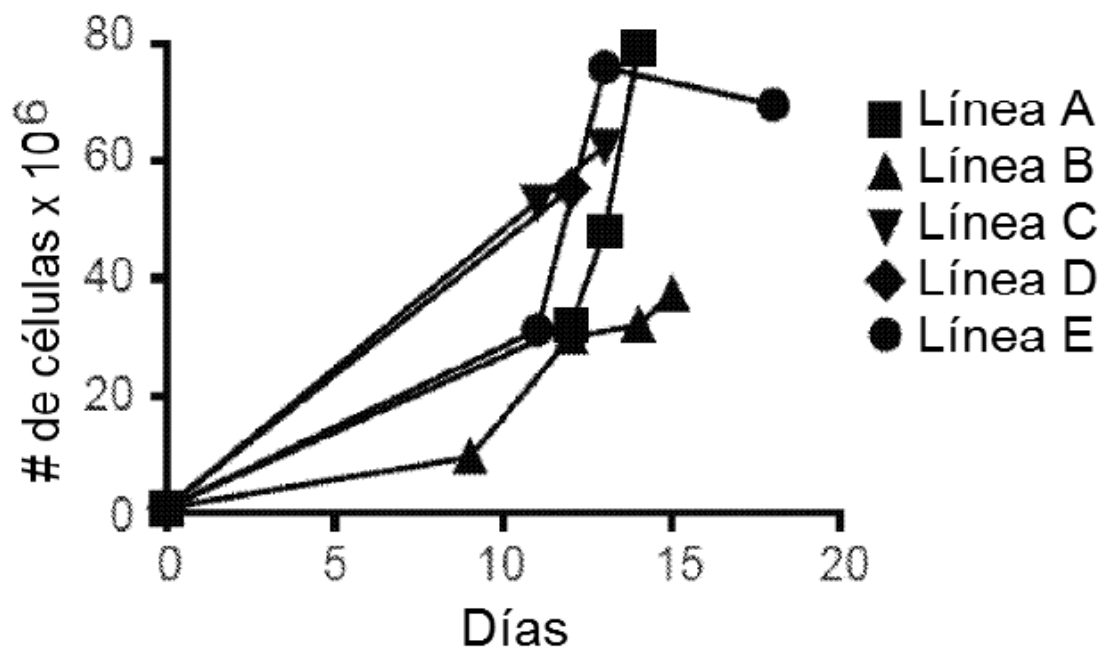


Figura 4B

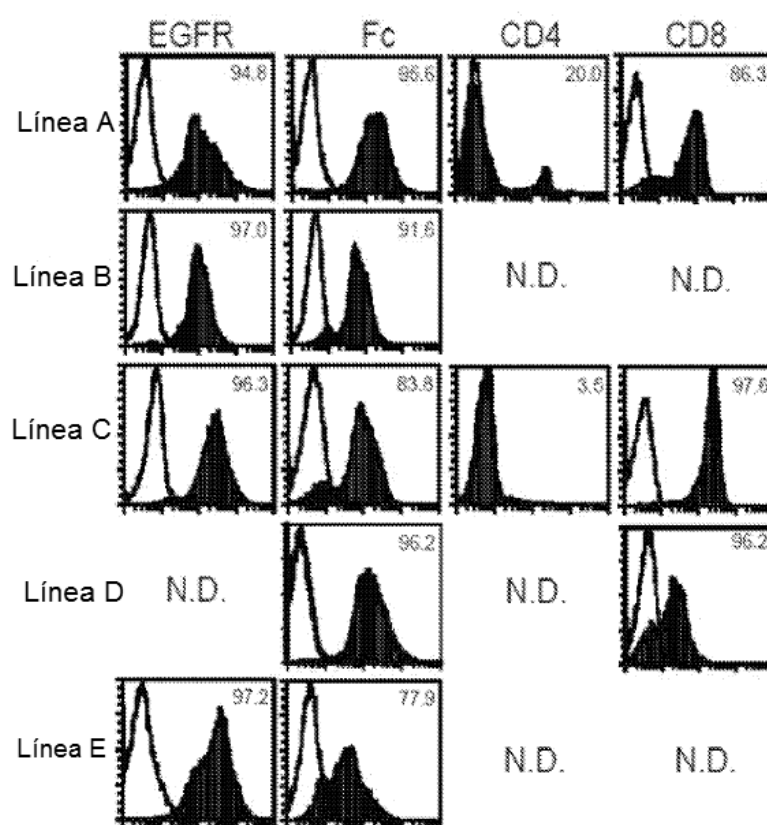


Figura 4C

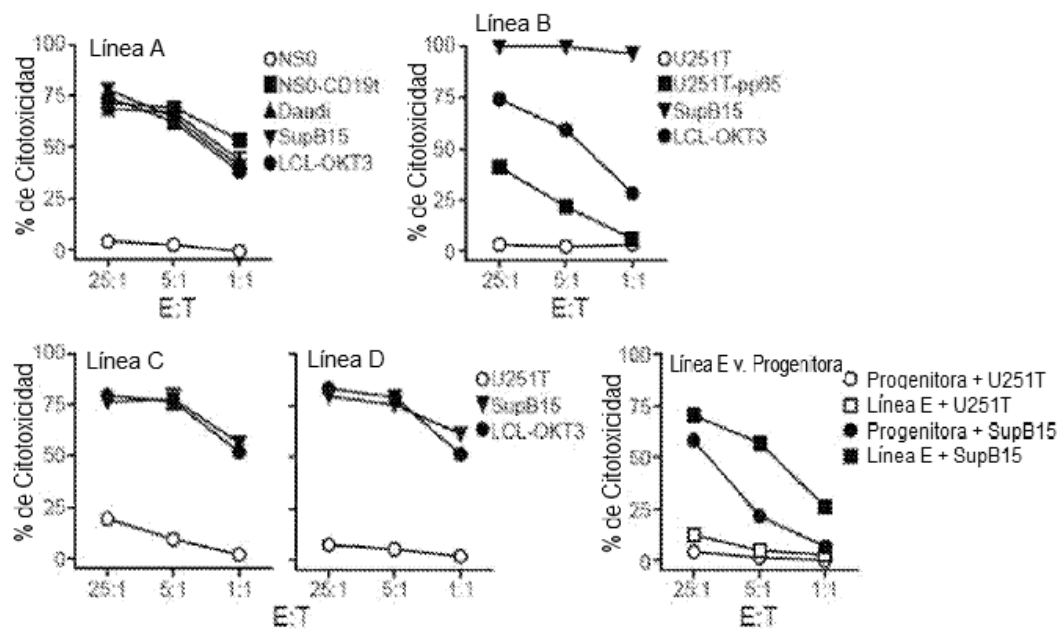


Figura 4D

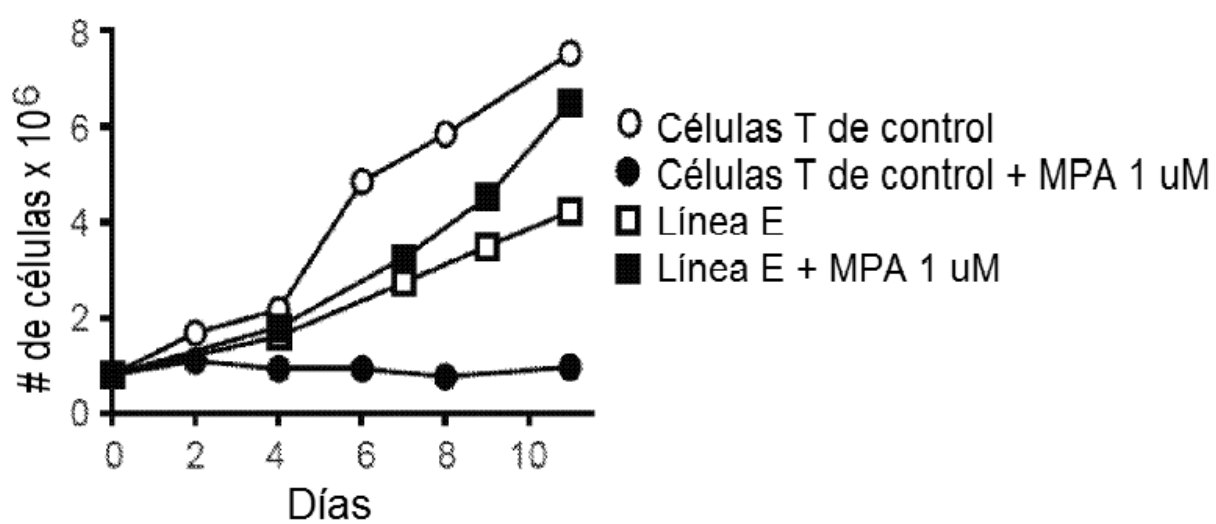


Figura 5

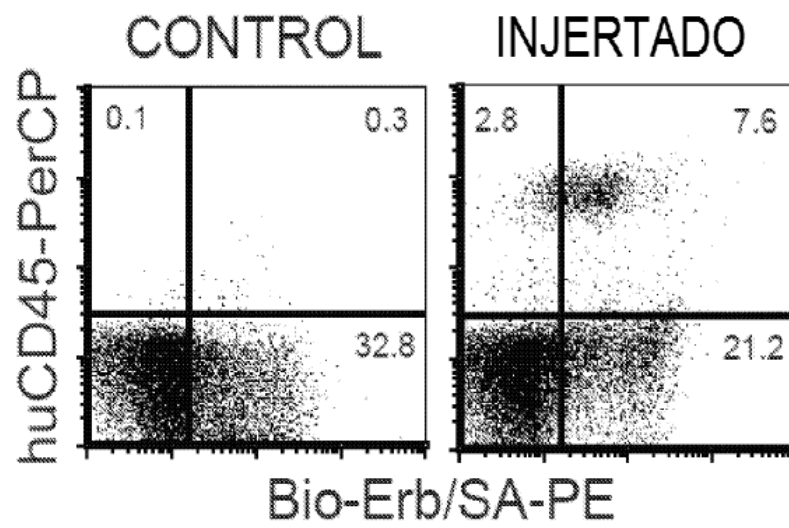


Figura 6

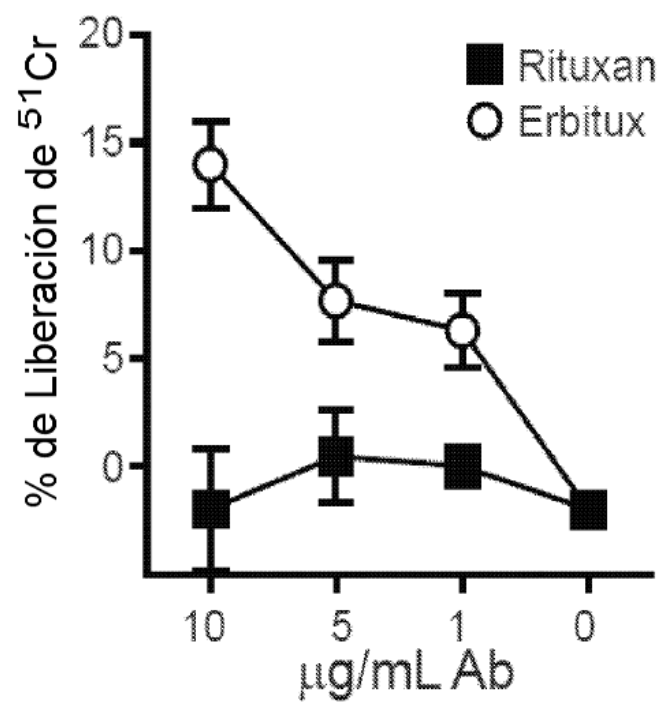


Figura 7

M L L L V T S L L L C E L P H P A F L L
 1 ATGCTTCTCC TGGTGACAAG CCTTCTGCTC TGTGAGTTAC CACACCCAGC ATTCCTCCTG
 TACGAAGAGG ACCACTGTTC GGAAGACGAG ACACTCAATG GTGTGGGTCG TAAGGAGGAC
 I P R K V C N G I G I G E F K D S L S I
 61 ATCCCACGCA AAGTGTGTAA CGGAATAGGT ATTGGTGAAT TTAAAGACTC ACTCTCCATA
 TAGGGTGCCT TTCACACATT GCCTTATCCA TAACCACTTA AATTTCTGAG TGAGAGGTAT
 N A T N I K H F K N C T S I S G D L H I
 121 AATGCTACGA ATATTAAACA CTTCAAAAAC TGCACCTCCA TCAGTGGCGA TCTCCACATC
 TTACGATGCT TATAATTTGT GAAGTTTTTG ACGTGGAGGT AGTCACCGCT AGAGGTGTAG
 L P V A F R G D S F T H T P P L D P Q E
 181 CTGCCGGTGG CATTTAGGGG TGACTCCTTC ACACATACTC CTCCTCTGGA TCCACAGGAA
 GACGGCCACC GTAAATCCCC ACTGAGGAAG TGTGTATGAG GAGGAGACCT AGGTGTCCCT
 L D I L K T V K E I T G F L L I Q A W P
 241 CTGGATATTC TGAAAACCGT AAAGGAAATC ACAGGGTTTT TGCTGATTCA GGCTTGGCCT
 GACCTATAAG ACTTTTGGCA TTTCTTTAG TGTCCCAAAA ACGACTAAGT CCGAACCGGA
 E N R T D L H A F E N L E I I R G R T K
 301 GAAAACAGGA CGGACCTCCA TGCCTTTGAG AACCTAGAAA TCATACGCGG CAGGACCAAG
 CTTTTGTCTT GCCTGGAGGT ACGGAAACTC TTGGATCTTT AGTATGCGCC GTCCTGGTTC
 Q H G Q F S L A V V S L N I T S L G L R
 361 CAACATGGTC AGTTTTCTCT TGCAGTCGTC AGCCTGAACA TAACATCCTT GGGATTACGC
 GTTGTACCAG TCAAAAGAGA ACGTCAGCAG TCGGACTTGT ATTGTAGGAA CCCTAATGCG
 S L K E I S D G D V I I S G N K N L C Y
 421 TCCCTCAAGG AGATAAGTGA TGGAGATGTG ATAATTTTCTG GAAACAAAAA TTTGTGCTAT
 AGGGAGTTCC TCTATTCACT ACCTCTACAC TATTAAAGTC CTTTGTTTTT AAACACGATA
 A N T I N W K K L F G T S G Q K T K I I
 481 GCAAAATACAA TAAACTGGAA AAAACTGTTT GGGACCTCCG GTCAGAAAAA CAAAATTATA
 CGTTTATGTT ATTTGACCTT TTTTGACAAA CCCTGGAGGC CAGTCTTTTG GTTTTAATAT
 S N R G E N S C K A T G Q V C H A L C S
 541 AGCAACAGAG GTGAAACAG CTGCAAGGCC ACAGGCCAGG TCTGCCATGC CTTGTGCTCC
 TCGTTGTCTC CACTTTTGTC GACGTTCCGG TGTCCGGTCC AGACGGTACG GAACACGAGG
 P E G C W G P E P R D C V S C R N V S R
 601 CCCGAGGGCT GCTGGGGCCC GGAGCCCAGG GACTGCGTCT CTTGCCGGAA TGTACGCCGA
 GGGTCTCCGA CGACCCCGGG CCTCGGGTCC CTGACGCAGA GAACGCCTT ACAGTCGGCT
 G R E C V D K C N L L E G E P R E F V E
 661 GGCAGGGAAT GCGTGGACAA GTGCAACCTT CTGGAGGGTG AGCCAAGGGA GTTTGTGGAG
 CCGTCCCTTA CGCACCTGTT CACGTGGAA GACCTCCAC TCGGTCCCT CAAACACCTC
 N S E C I Q C H P E C L P Q A M N I T C
 721 AACTCTGAGT GCATACAGTG CCACCCAGAG TGCCTGCCTC AGGCCATGAA CATCACCTGC
 TTGAGACTCA CGTATGTCAC GGTGGGTCTC ACGGACGGAG TCCGGTACTT GTAGTGGACG
 T G R G P D N C I Q C A H Y I D G P H C
 781 ACAGGACGGG GACCAGACAA CTGTATCCAG TGTGCCCACT ACATTGACGG CCCCCACTGC
 TGTCTGCCC CTGGTCTGTT GACATAGGTC ACACGGGTGA TGTAACCTGCC GGGGGTGACG
 V K T C P A G V M G E N N T L V W K Y A
 841 GTCAAGACCT GCCCGGCAGG AGTCATGGGA GAAAACAACA CCCTGGTCTG GAAGTACGCA
 CAGTTCTGGA CGGGCCGTCC TCAGTACCCT CTTTGTGTGT GGGACCAGAC CTTTCATGCGT
 D A G H V C H L C H P N C T Y G C T G P
 901 GACGCCGGCC ATGTGTGCCA CCTGTGCCAT CCAAACTGCA CCTACGGATG CACTGGGCCA
 CTGCGCCCGG TACACACGGT GGACACGGTA GGTTTGACGT GGATGCCTAC GTGACCCGGT
 G L E G C P T N G P K I P S I A T G M V
 961 GGTCTTGAAG GCTGTCCAAC GAATGGGCCT AAGATCCCGT CCATCGCCAC TGGGATGGTG
 CCAGAACTTC CGACAGGTTG CTTACCCGGA TTCTAGGGCA GGTAGCGGTG ACCCTACCAC
 G A L L L L L V V A L G I G L F M
 1021 GGGGCCCTCC TCTTGCTGCT GGTGGTGGCC CTGGGGATCG GCCTCTTCAT G
 CCCCCGGAGG AGAACGACGA CCACCACCGG GACCCTAGC CGGAGAAGTA C

Figura 8 CD19R-CD28gg-Zeta(CO)-T2A-EGFRt

```

      M L L L V T S L L L C E L P H P A F L L
1  ATGCTGCTGC TGGTGACCAG CCTGCTGCTG TGCAGAGCTGC CCCACCCCGC CTTTCTGCTG
   TACGACGACG ACCACTGGTC GGACGACGAC ACCTCGACG GGGTGGGGCG GAAAGACGAC
   I P D I Q M T Q T T S S L S A S L G D R
61 ATCCCCGACA TCCAGATGAC CCAGACCACC TCCAGCCTGA GCGCCAGCCT GGGCGACCGG
   TAGGGGCTGT AGGTCTACTG GGTCTGGTGG AGGTGCGACT CGCGGTCGGA CCCGCTGGCC
   V T I S C R A S Q D I S K Y L N W Y Q Q
121 GTGACCATCA GCTGCCGGGC CAGCCAGGAC ATCAGCAAGT ACCTGAACTG GTATCAGCAG
   CACTGGTAGT CGACGGCCCG GTCGGTCCTG TAGTCGTTCA TGGACTTGAC CATAGTCGTC
   K P D G T V K L L I Y H T S R L H S G V
181 AAGCCCGACG GCACCGTCAA GCTGCTGATC TACCACACCA GCCGGCTGCA CAGCGGCGTG
   TTCGGGCTGC CGTGGCAGTT CGACGACTAG ATGGTGTGGT CGGCCGACGT GTCGCCGCAC
   P S R F S G S G S G T D Y S L T I S N L
241 CCCAGCCGGT TTAGCGGCAG CGGCTCCGGC ACCGACTACA GCCTGACCAT CTCCAACCTG
   GGGTCGGCCA AATCGCCGTC GCCGAGGCCG TGGCTGATGT CGGACTGGTA GAGGTGGAC
   E Q E D I A T Y F C Q Q G N T L P Y T F
301 GAACAGGAAG ATATCGCCAC CTACTTTTGC CAGCAGGGCA ACACACTGCC CTACACCTTT
   CTTGTCTTTC TATAGCGGTG GATGAAAACG GTCGTCCCGT TGTGTGACGG GATGTGGAAA
   G G G T K L E I T G S T S G S G K P G S
361 GCGCGCGGAA CAAAGCTGGA AATCACCAGC AGCACCTCCG GCAGCGGCAA GCCTGGCAGC
   CCGCCGCCCTT GTTTCGACCT TTAGTGGCCG TCGTGAGGCG CGTCGCCGTT CGGACCGTCG
   G E G S T K G E V K L Q E S G P G L V A
421 GCGAGGGGCA GCACCAAGGG CGAGGTGAAG CTGCAGGAAA GCGGCCCTGG CCTGGTGGCC
   CCGCTCCCGT CGTGGTTCCT GCTCCACTTC GACGTCCCTT CGCCGGGACC GGACACCGG
   P S Q S L S V T C T V S G V S L P D Y G
481 CCCAGCCAGA GCCTGAGCGT GACCTGCACC GTGAGCGGCG TGAGCCTGCC CGACTACGGC
   GGGTCGGTCT CGGACTCGCA CTGGACGTGG CACTCGCCGC ACTCGGACGG GCTGATGCCG
   V S W I R Q P P R K G L E W L G V I W G
541 GTGAGCTGGA TCCGGCAGCC CCCAGGAAG GGCCTGGAAT GGCTGGGCGT GATCTGGGGC
   CACTCGACCT AGGCCGTCGG GGGGTCTTTC CCGGACCTTA CCGACCCGCA CTAGACCCCG
   S E T T Y Y N S A L K S R L T I I K D N
601 AGCGAGACCA CCTACTACAA CAGCGCCCTG AAGAGCCGGC TGACCATCAT CAAGGACAAC
   TCGCTCTGGT GGATGATGTT GTCGCGGGAC TTCTCGGCCG ACTGGTAGTA GTTCTGTGTG
   S K S Q V F L K M N S L Q T D D T A I Y
661 AGCAAGAGCC AGGTGTTTCT GAAGATGAAC AGCCTGCAGA CCGACGACAC CGCATCTAC
   TCGTCTCGG TCCACAAGGA CTTTCTACTT TCGGACGTCT GGCTGCTGTG GCGGTAGATG
   Y C A K H Y Y Y G G S Y A M D Y W G Q G
721 TACTGCGCCA AGCACTACTA CTACGGCGGC AGCTACGCCA TGGACTACTG GGGCCAGGGC
   ATGACGCGGT TCGTGATGAT GATGCCGCCG TCGATGCGGT ACCTGATGAC CCCGTCCCG
   T S V T V S S E S K Y G P P C P P C P A
781 ACCAGCGTGA CCGTGAGCAG CGAGAGCAA GACGGCCCTC CTGCCCCCCT TTGCCCTGCC
   TGGTCGCACT GGCACGTCG GCTCTCGTTC ATGCCGGGAG GGACGGGGGG AACGGGACGG
   P E F L G G P S V F L F P P K P K D T L
841 CCCGAGTTCC TGGGCGGACC CAGCGTGTTT CTGTTCCCCC CCAAGCCCAA GGACACCCCTG
   GGGCTCAAGG ACCCGCCTGG GTCGCACAAG GACAAGGGGG GGTTCGGGTT CCTGTGGGAC
   M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P
901 ATGATCAGCC GGACCCCGCA GGTGACCTGC GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA GGAAGATCCC
   TACTAGTCGG CCTGGGGGCT CCACTGGACG CACCACCACC TGCACCTCGT CCTTCTAGGG
   E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P
961 GAGGTCCAGT TCAATTGGTA CGTGGACGGC GTGGAAGTGC ACAACGCCAA GACCAAGCCC
   CTCCAGGTCA AGTTAACCAT GCACCTGCCG CACCTTCACG TGTTCGGGTT CTGGTTCGGG

      R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q
1021 AGAGAGGAAC AGTTCAACAG CACCTACCGG GTGGTGTCTG TGCTGACCGT GCTGCACCAG
   TCTCTCCTTG TCAAGTTGTC GTGGATGGCC CACCACAGAC ACGACTGGCA CGACGTGGTC
   D W L N G K E Y K C K V S N K G L P S S
1081 GACTGGCTGA ACGGCAAGA ATACAAGTGC AAGGTGTCCA ACAAGGGCCT GCCCAGCAGC
   CTGACCGACT TGCCGTTTCT TATGTTACAG TTCCACAGGT TGTTCCCGGA CGGGTCGTCG

```

I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L
 1141 ATCGAAAAGA CCATCAGCAA GGCCAAGGGC CAGCCTCGCG AGCCCCAGGT GTACACCCCTG
 TAGCTTTTCT GGTAGTCGTT CCGGTTCCTG GTCGGAGCGC TCGGGGTCCA CATGTGGGAC
 P P S Q E E M T K N Q V S L T C L V K G
 1201 CCTCCCTCCC AGGAAGAGAT GACCAAGAAC CAGGTGTCCC TGACCTGCCT GGTGAAGGGC
 GGAGGGAGGG TCCTTCTCTA CTGGTCTTGT GTCCACAGGG ACTGGACGGA CCACCTCCCG
 F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y
 1261 TTCTACCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAACG GCCAGCCTGA GAACAACCTAC
 AAGATGGGGT CGCTGTAGCG GCACCTCACC CTCTCGTTGC CGGTGCGACT CTTGTTGATG
 K T T P P V L D S D G S F F L Y S R L T
 1321 AAGACCACCC CTCCCGTCTG GGACAGCGAC GGCAGCTTCT TCCTGTACAG CCGGCTGACC
 TTCTGGTGGG GAGGGCACGA CCTGTCGCTG CCGTCGAAGA AGGACATGTC GGCAGCTGG
 V D K S R W Q E G N V F S C S V M H E A
 1381 GTGGACAAGA GCCGGTGGCA GGAAGGCAAC GTCTTTAGCT GCAGCGTGAT GCACGAGGCC
 CACCTGTTCT CGGCCACCGT CCTTCCGTTG CAGAAATCGA CGTCGCACTA CGTGCTCCGG
 L H N H Y T Q K S L S L S L G K M F W V
 1441 CTGCACAACC AGTACACCCA GAAAGACCTG AGCCTGTCCC TGGGCAAGAT GTTCTGGGTG
 GACGTGTTGG TGATGTGGGT CTTCTCGGAC TCGGACAGGG ACCCGTTCTA CAAGACCCAC
 L V V V G G V L A C Y S L L V T V A F I
 1501 CTGGTGGTGG TGGGCGGGGT GCTGGCCTGC TACAGCCTGC TGGTGACAGT GGCCTTCATC
 GACCACCACC ACCCGCCCCA CGACCGGACG ATGTCGGACG ACCACTGTCA CCGGAAGTAG
 I F W V R S K R S R G G H S D Y M N M T
 1561 ATCTTTTGGG TGCGGAGCAA GCGGAGCAGA GCGGGCCACA GCGACTACAT GAACATGACC
 TAGAAAACCC ACGCTCGTCT CGCCTCGTCT CCGCCGGTGT CGCTGATGTA CTTGTACTGG
 P R R P G P T R K H Y Q P Y A P P R D F
 1621 CCCAGACGGC CTGGCCCCAC CCGGAAGCAC TACCAGCCCT ACGCCCCACC CAGGGACTTT
 GGGTCTGCGG GACCGGGGTG GGCCTTCGTG ATGGTCGGGA TGCGGGGTGG GTCCCTGAAA
 A A Y R S G G G R V K F S R S A D A P A
 1681 GCCGCCTACC GGTCCGCGCG AGGCGGGGTG AAGTTCAGCA GAAGCGCCGA CGCCCCTGCC
 CGGCGGATGG CCAGGCCGCC TCCGCCCCAC TTCAAGTCGT CTTGCGGGCT GCGGGGACGG
 Y Q Q G Q N Q L Y N E L N L G R R E E Y
 1741 TACCAGCAGG GCCAGAAATCA GCTGTACAAC GAGCTGAACC TGGGCAAGAG GGAAGAGTAC
 ATGGTCGTCC CGGTCTTAGT CGACATGTTG CTCGACTTGG ACCCGTCTTC CTTTCTCATG
 D V L D K R R G R D P E M G G K P R R K
 1801 GACGTCTTGG ATAAGCGGAG AGGCCGGGAC CCTGAGATGG GCGGCAAGCC TCGGCGGAAG
 CTGACGAGCC TATTCGCTTC TCCGCCCCCTG GGAATCTACC CGCCGTTCGG AGCCGCCCTC
 N P Q E G L Y N E L Q K D K M A E A Y S
 1861 AACCCCCAGG AAGGCCTGTA TAACGAATG CAGAAAGACA AGATGGCCGA GGCCTACAGC
 TTGGGGGTCC TTCCGGACAT ATTGCTTGAC GTCTTTCTGT TCTACCGGCT CCGGATGTCG
 E I G M K G E R R R G K G H D G L Y Q G
 1921 GAGATCGGCA TGAAGGGCGA GCGGAGGCGG GGCAAGGGCC ACGACGGCCT GTATCAGGGC
 CTCTAGCCGT ACTTCCCGCT CGCCTCCGCC CCGTTCGCCG TGCTGCCGGA CATAGTCCCG
 L S T A T K D T Y D A L H M Q A L P P R
 1981 CTGTCCACCG CCACCAAGGA TACCTACGAC GCCCTGCACA TGCAGGCCCT GCCCCCAAGG
 GACAGGTGGC GGTGGTTCCT ATGGATGCTG CCGGACGTGT ACGTCCGGGA CCGGGGTTC
 L E G G G E G R G S L L T C G D V E E N
 2041 CTCGAGGGCG GCGGAGAGGG CAGAGGAAGT CTTCTAACAT GCGGTGACGT GGAGGAGAAT
 GAGCTCCCGC CGCCTCTCCC GTCTCCTTCA GAAGATTGTA CGCCACTGCA CCTCCTCTTA
 P G P R M L L L V T S L L L C E L P H P
 2101 CCCGGCCCTA GGATGCTTCT CCTGGTGACA AGCCTTCTGC TCTGTGAGTT ACCACACCCA
 GGGCCGGGAT CCTACGAAGA GGACCACTGT TCGGAAGACG AGACACTCAA TGGTGTGGGT
 A F L L I P R K V C N G I G I G E F K D
 2161 GCATTCTCTC TGATCCACAG CAAAGTGTGT AACGGAATAG GTATTGGTGA ATTTAAAGAC
 CGTAAGGAGG ACTAGGGTGC GTTTCACACA TTGCCTTATC CATAACCACT TAAATTTCTG
 S L S I N A T N I K H F K N C T S I S G
 2221 TCACTCTCCA TAAATGCTAC GAATATTTAA CACTTCAAAA ACTGCACCTC CATCAGTGGC
 AGTGAGAGGT ATTTACGATG CTTATAATTT GTGAAGTTTT TGACGTGGAG GTAGTCACCG
 D L H I L P V A F R G D S F T H T P P L
 2281 GATCTCCACA TCCTGCCGGT GGCATTTAGG GGTGACTCCT TCACACATAC TCCTCCTCTG
 CTAGAGGTGT AGGACGGCCA CCGTAAATCC CCACTGAGGA AGTGTGTATG AGGAGGAGAC
 D P Q E L D I L K T V K E I T G F L L I

2341 GATCCACAGG AACTGGATAT TCTGAAAACC GTAAAGGAAA TCACAGGGTT TTTGCTGATT
 CTAGGTGTCC TTGACCTATA AGACTTTTGG CATTTCCCTT AGTGTCCTAA AAACGACTAA
 Q A W P E N R T D L H A F E N L E I I R
 2401 CAGGCTTGGC CTGAAAACAG GACGGACCTC CATGCCTTTG AGAACCTAGA AATCATACGC
 GTCCGAACCG GACTTTTGTG CTGCCTGGAG GTACGGAAC TCTTGATCT TTAGTATGCG
 G R T K Q H G Q F S L A V V S L N I T S
 2461 GGCAGGACCA AGCAACATGG TCAGTTTTCT CTTGCAGTCG TCAGCCTGAA CATAACATCC
 CCGTCTGGT TCGTTGTACC AGTCAAAAGA GAACGTCAGC AGTCGGACTT GTATTGTAGG
 L G L R S L K E I S D G D V I I S G N K
 2521 TTGGGATTAC GCTCCCTCAA GGAGATAAGT GATGGAGATG TGATAATTTT AGGAAACAAA
 AACCTAATG CGAGGGAGTT CCTCTATTCA CTACCTCTAC ACTATTAAAG TCCTTTGTTT
 N L C Y A N T I N W K K L F G T S G Q K
 2581 AATTGTGCT ATGCAAATAC AATAAACTGG AAAAACTGT TTGGGACCTC CGGTACGAAA
 TTAACACGA TACGTTTATG TTATTTGACC TTTTITGACA AACCTGGAG GCCAGTCTTT
 T K I I S N R G E N S C K A T G Q V C H
 2641 ACCAAAATTA TAAGCAACAG AGGTGAAAAC AGCTGCAAGG CCACAGGCCA GGTCTGCCAT
 TGGTTTAAAT ATTCGTTGTC TCCACTTTTG TCGACGTTCC GGTGTCCGGT CCAGACGGTA
 A L C S P E G C W G P E P R D C V S C R
 2701 GCCTTGTGCT CCCCCGAGGG CTGCTGGGGC CCGGAGCCCA GGGACTGCGT CTCTTGCCGG
 CGGAACACGA GGGGGCTCCC GACGACCCCG GGCTCGGGT CCCTGACGCA GAGAACGGCC
 N V S R G R E C V D K C N L L E G E P R
 2761 AATGTCAGCC GAGGCAGGGA ATGCGTGGAC AAGTGCAACC TTCTGGAGGG TGAGCCAAGG
 TTACAGTCGG CTCCGTCCCT TACGCACCTG TTCACGTTGG AAGACCTCCC ACTCGGTTCC
 E F V E N S E C I Q C H P E C L P Q A M
 2821 GAGTTTGTGG AGAACTCTGA GTGCATACAG TGCCACCCAG AGTGCCTGCC TCAGGCCATG
 CTCAAACACC TCTTGAGACT CACGTATGTC ACGGTGGGTC TCACGGACGG AGTCCGGTAC
 N I T C T G R G P D N C I Q C A H Y I D
 2881 AACATCACCT GCACAGGACG GGGACCAGAC AACTGTATCC AGTGTGCCCA CTACATTGAC
 TTGTAGTGA CGTGTCTGTC CCCTGGTCTG TTGACATAGG TCACACGGGT GATGTAAGT
 G P H C V K T C P A G V M G E N N T L V
 2941 GGCCCCCACT GCGTCAAGAC CTGCCCCGCA GGAGTCATGG GAGAAAACAA CACCCTGGTC
 CCGGGGGTGA CGCAGTTCTG GACGGGCCGT CCTCAGTACC CTCTTTTGTG GTGGGACCAG
 W K Y A D A G H V C H L C H P N C T Y G
 3001 TGGAAGTACG CAGACGCCGG CCATGTGTGC CACCTGTGCC ATCCAAACTG CACCTACGGA
 ACCTTCATGC GTCTGCGGCC GGTACACACG GTGGACACGG TAGGTTTGAC GTGGATGCCT
 C T G G P G L E G C P T N G P K I P S I A
 3061 TGCACTGGGC CAGGTCTTGA AGGCTGTCCA ACGAATGGGC CTAAGATCCC GTCCATCGCC
 ACGTGACCCG GTCCAGAACT TCCGACAGGT TGCTTACCCG GATTCTAGGG CAGGTAGCGG
 T G M V G A L L L L L V V A L G I G L F
 3121 ACTGGGATGG TGGGGGCCCT CCTCTTGCTG CTGGTGGTGG CCCTGGGGAT CGGCCCTCTC
 TGACCTTACC ACCCCCGGGA GGAGAACGAC GACCACCACC GGGACCCCTA GCCGAGAAG
 M *
 3181 ATGTGA
 TACACT

Figura 9

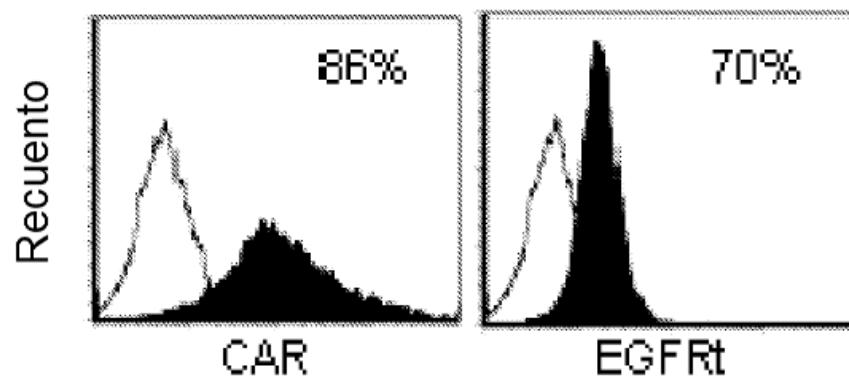


Figura 10

