

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 833 162**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**C07K 14/725** (2006.01)

**C07K 16/30** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.07.2015 PCT/EP2015/066252**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.01.2016 WO16008973**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2015 E 15738356 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2020 EP 3169703**

54 Título: **Receptor de antígeno quimérico y su uso**

30 Prioridad:

**16.07.2014 EP 14177278**

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

**14.06.2021**

73 Titular/es:

**ABKEN, HINRICH (50.0%)  
Gotthard-Bauer-Str. 1  
94333 Geiselhöring-Hainsbach, DE y  
HOMBACH, ANDREAS (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ABKEN, HINRICH y  
HOMBACH, ANDREAS**

74 Agente/Representante:

**LOZANO GANDIA, José**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o  
Bemerkungen) en el folleto original publicado por  
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 833 162 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 de antígeno quimérico y su uso

- 5 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido recombinante que contiene un dominio que comprende al menos dos unidades de anticuerpo, mediante lo cual una unidad de anticuerpo es una unidad de anticuerpo anti-CD30 de cadena sencilla mientras que otra unidad de anticuerpo es una unidad de anticuerpo que es específica de un antígeno presente en la superficie de una célula diana predeterminada según la reivindicación 1 o la reivindicación 2. En particular, la presente invención se refiere a un polipéptido recombinante que contiene al menos los siguientes dominios comenzando desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal: un primer dominio que contiene una unidad de anticuerpo anti-CD30 de cadena sencilla de HRS3-scFv de SEQ ID NO: 2 y una unidad de anticuerpo, siendo dicha unidad de anticuerpo específica de un antígeno presente en la superficie de una célula diana predeterminada, concretamente, siendo específica de un antígeno asociado a tumor; opcionalmente, un dominio espaciador; un dominio transmembrana; y un dominio de señalización citoplásmica. Del mismo modo, el polipéptido recombinante puede estar dispuesto en orden, en el que el dominio que comprende al menos dos unidades de anticuerpo tiene el orden: un primer dominio que contiene una unidad de anticuerpo específica de un antígeno asociado a tumor y el segundo dominio que contiene una unidad de anticuerpo anti-CD30 de cadena sencilla. En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica para el polipéptido según la presente invención, así como a vectores y a células que contienen los mismos. Además, se proporcionan células T aisladas, como una célula T CD8<sup>+</sup> o CD4<sup>+</sup>, que expresan en su superficie receptores de antígeno quimérico que contienen una unidad de anticuerpo anti-CD30 de cadena sencilla y una unidad de anticuerpo, mediante lo cual dicha unidad de anticuerpo es específica de un antígeno presente en la superficie de una célula diana predeterminada.
- 25 Estas células son particularmente útiles en el tratamiento de cáncer, en particular cáncer CD30<sup>+</sup>. Es decir, las células son para su uso en terapia celular adoptiva para tratar cáncer en un sujeto que lo necesita.

## Técnica anterior

- 30 La transferencia adoptiva de células T ha demostrado una eficacia significativa en el tratamiento de tumores malignos y puede ser curativa en pacientes con diversas enfermedades, incluyendo leucemia o tumores malignos asociados al virus de Epstein Barr. Normalmente, las células T derivadas del paciente se modifican por ingeniería *ex vivo* para expresar un receptor de células T recombinante o, alternativamente, un receptor de antígeno quimérico. Dicho receptor de antígeno quimérico (CAR, *Chimeric Antigen Receptor*) se compone normalmente de un dominio de unión a antígeno extracelular derivado de un anticuerpo y un dominio de activación de células T intracelular derivado del endodominio del receptor de células T. A diferencia del TCR fisiológico, el CAR se compone de una sola cadena de polipéptido que combina la unión del antígeno a través del resto extracelular con una maquinaria de activación de células T proporcionada por el resto de señalización intracelular. Por tanto, debido al dominio de unión derivado del anticuerpo, las células T modificadas con CAR reconocen su diana, normalmente, un antígeno de superficie celular, independientemente de la presentación de antígeno del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), y no se ven comprometidas por variantes de células tumorales con posesión reducida o deficiente de antígeno, que representa un mecanismo observado comúnmente del escape inmunitario tumoral. Los CAR se encuentran en el foco de investigación en los últimos años. En particular, su capacidad para dirigir y lisar células predefinidas se encuentra en el foco de la inmunoterapia. Ensayos clínicos recientes han destacado el potencial de la terapia adaptativa de cáncer con células T redirigidas con CAR. Por ejemplo, los pacientes con neuroblastoma tratados con células T de CAR específicas de gangliósido GD2 mostraron algunos efectos antitumorales alentadores, aunque las células T persisten sólo durante un breve periodo. Estudios adicionales probaron el concepto de que las células T modificadas por ingeniería con CAR pueden iniciar una respuesta antitumoral productiva en pacientes que padecen diversos tumores malignos. El enfoque con CAR difiere de otras estrategias de terapia inmunitaria mediada por anticuerpos, por ejemplo, usando inmunotoxinas, en la medida en que se usan células modificadas por ingeniería en lugar de moléculas individuales.

- En los últimos años, se han realizado esfuerzos en la optimización del diseño de CAR, véase, por ejemplo, Bridgeman J.S., *et al.*, *Curr Gene Ther* 2010, 10, 77-90. Sin embargo, sigue habiendo muchos desafíos, en particular, la necesidad de una respuesta antitumoral más efectiva y la prolongación de la supervivencia de células T que permita una persistencia a largo plazo de las células T de dichas células T modificadas por ingeniería en el cuerpo. Además, las señales coestimuladoras requeridas para una aplicación clínica con éxito siguen siendo ilusorias, por ejemplo, véase Hombach A, *et al.*, *Curr Mol Med*. Agosto de 2013; 13(7):1079-88. Así, existe trabajo en curso sobre la optimización de CAR para diversos enfoques, incluyendo la inmunoterapia adaptativa.

- 60 Hombach A., *et al.*, *Gene Therapy*, 2010, 17, 1206-1213 describen la modificación del dominio espaciador de IgG1-Fc en el resto extracelular de receptores de antígeno quiméricos para evitar la activación fuera de la diana y el inicio imprevisto de una respuesta inmunitaria innata. En ese documento, se han usado células T modificadas por ingeniería con CAR modificado, o bien un CAR anti-CD30 o bien un CAR anti-CEA. Tal como se demostró en ese documento, las células T de CAR anti-CEA no son eficaces contra células negativas para CEA ni las células T de CAR anti-CD30 contra células CD30<sup>+</sup>. La modificación dada a conocer en esta publicación se refiere a evitar la

activación de la diana por el inicio imprevisto de la respuesta inmunitaria, por ejemplo, debido a la reactividad cruzada con un dominio espaciador en el resto extracelular del CAR.

En Kofler *et al.*, 2011, Mol. Ther. 19, 760-767 se describe una molécula de CAR que tiene un endodominio de CD28 combinado con un endodominio de CD3 y un ectodominio de scFv derivado de anticuerpo específico de CEA. En ese documento se describe que una delección del resto de unión Ick en el endodominio de CAR de CD28 mejora la actividad antitumoral redirigida en presencia de células T reguladoras sin alterar la secreción, la proliferación y la citólisis de interferón-gamma. Se especula que el CAR con el endodominio de CD28 modificado facilita la implementación de la terapia adoptiva con células T en pacientes con una variedad de tipos de cáncer que están muy infiltrados por células T reguladoras (células Treg).

Se proporciona un resumen del presente conocimiento sobre células T redirigidas con receptores de antígeno quiméricos en el artículo de revisión de Chmielewski M., *et al*, Frontiers in immunology, 2013, 4, 1-7, así como en Melenhorst JJ, Levine BL., Cytotherapy. Septiembre de 2013; 15(9):1046-53. Además, se proporciona un resumen de terapia adoptiva de cáncer con células T redirigidas con CAR en Hombach A., *et al.*, Curr Mol Med, 2013, 13(1), 1-10. En ese documento, se resumen los efectos de CAR, incluyendo la actividad de coestimulación así como la mejora y la prolongación de la respuesta antitumoral redirigida de las células T. Además, se describen los efectos adversos de esta clase de terapia adaptativa, incluyendo la "tormenta de citocinas" y la "represión de células T".

Recientemente, Chmielewski *et al*, Immunol Reviews vol. 257, 2014, p83-90 comentan la posibilidad de que las células T de CAR modificadas por ingeniería con una citocina inducible modulan el estroma tumoral.

Wilkie, S. *et al.*, J. Clin. Immunol., 2012, 32, 1059-1070 describen un doble direccionamiento de ErbB2 y MUC1 en cáncer de mama usando dos CAR independientes, cada uno capaz de la activación completa de células T. Kloss *et al.*, Nat Biotechnol. Enero de 2013; 31(1):71-5 notifican células T modificadas por ingeniería con dos CAR independientes que proporcionan señalización complementaria. Los vectores descritos en ese documento codifican para dos moléculas de CAR independientes expresadas simultáneamente por las propias células T.

Grada, Z. *et al.*, Molecular Therapy-Nucleic Acids, 2013, vol. 2, página 105 se refieren a TanCAR, un novedoso CAR biespecífico para la inmunoterapia contra el cáncer. Las moléculas de CAR descritas en ese documento están diseñadas para identificar ligandos, estando presentes ambas en la célula diana.

Es decir, las células T modificadas con receptores de antígeno quiméricos (CAR) usadas en la actualidad para el direccionamiento redirigido por antígenos hacia células tumorales muestran un rendimiento insuficiente en el ataque antitumoral debido a diversos motivos, en particular, debido a una amplificación y una actividad citolítica menores después de la transferencia adoptiva al paciente. Así, el mayor obstáculo de la estrategia para su uso clínico es el rendimiento insuficiente de las células T modificadas por ingeniería a largo plazo.

Además, aparte del efecto beneficioso de las células T que expresan CAR en la terapia adoptiva, se conocen efectos de sobra que actualmente dificultan el desarrollo favorito de la terapia respectiva tal como se mencionó anteriormente.

#### Breve descripción de la presente invención

La presente invención tiene como objetivo mejorar la persistencia y el rendimiento de células T de CAR.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido recombinante, tal como se define en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que contiene al menos los siguientes dominios comenzando desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal: un primer dominio que contiene una unidad de anticuerpo anti-CD30 de cadena sencilla de HRS3-scFv de SEQ ID NO: 2 y una unidad de anticuerpo, siendo dicha unidad de anticuerpo específica de un antígeno presente en la superficie de una célula diana predeterminada que es específica de un antígeno asociado a tumor; opcionalmente, un dominio espaciador; un dominio transmembrana; y un dominio de señalización citoplásmica. En particular, la presente invención se refiere a un péptido recombinante en el que el primer dominio comprende la unidad de anticuerpo anti-CD30 de cadena sencilla en combinación con una unidad de anticuerpo, mediante lo cual esta unidad de anticuerpo es específica de un antígeno asociado a tumor. La unidad de anticuerpo anti-CD30 de cadena sencilla es el HRS3-scFv de SEQ ID NO: 2, mientras que la unidad de anticuerpo es una unidad que se une al antígeno asociado a tumor del antígeno carcinoembrionario (CEA), en particular de SEQ ID NO: 4. En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica para el polipéptido según la presente invención, así como a un vector que comprende dicha secuencia de ácido nucleico. Además, se proporciona una célula aislada, una línea de células o una célula huésped que contiene dicha secuencia de ácido nucleico o dicho vector.

Además, la presente invención se refiere a una célula T aislada, como una célula T CD8<sup>+</sup> y/o CD4<sup>+</sup>, que expresa en su superficie receptores de antígeno quiméricos que tienen en su dominio extracelular dos unidades de anticuerpo, una unidad de anticuerpo que es específica de un antígeno presente en la superficie de una célula diana predeterminada y una unidad de anticuerpo anti-CD30 de cadena sencilla, tal como se define en las

reivindicaciones. Estas unidades están o bien presentes en un único polipéptido, tal como se define en el presente documento, o bien presentes en receptores de antígeno quiméricos funcionales diferentes. Estas células son particularmente útiles para tratar células tumorales que expresan el antígeno en su superficie pero que no pueden expresar CD30 en su superficie. Es decir, combinando estas dos unidades, concretamente, la unidad de anticuerpo anti-CD30 de cadena sencilla y un dominio de anticuerpo que es específico de un antígeno asociado a tumor, pueden tratarse de manera más eficaz células tumorales que expresan el antígeno específico de tumor en su superficie pero que son CD30<sup>-</sup>. Así, en el presente documento, se describe un método para tratar sujetos que padecen cáncer, mediante lo cual las células tumorales de dicho cáncer expresan el antígeno pero son CD30<sup>-</sup> (negativas para CD30).

En particular, las células útiles para la terapia adoptiva con células según la presente invención expresan en su superficie receptores de antígeno quiméricos que tienen en el dominio extracelular la unidad de anticuerpo que es específica de un antígeno presente en la superficie de una célula predeterminada, en particular, en los que la unidad de anticuerpo es una unidad de anticuerpo que es específica de un antígeno asociado a tumor, y una unidad de anticuerpo anti-CD30 de cadena sencilla, mediante lo cual estas dos unidades pueden estar presentes o bien en un único polipéptido que representa un CAR o bien pueden estar presentes en receptores de antígeno quiméricos funcionales diferentes.

### Breve descripción de los dibujos

Figura 1: representación esquemática de la composición modular de las moléculas de CAR. El n.º 1138 representa el CAR anti-CD30; el n.º 946 representa el CAR anti-CEA. El CAR n.º 1457 es la molécula de CAR biespecífica según la presente invención que se compone del anticuerpo anti-CD30 de cadena sencilla de HRS3-scFv, el scFv anti-CEA BW431/26, el dominio espaciador de IgG1-Fc, el dominio transmembrana de CD28 y el dominio de señalización citoplásmica de la cadena CD28ΔLCK y CD3zeta.

Figura 2: se modificaron por ingeniería linfocitos de sangre periférica con CAR mediante procedimientos convencionales. Después del cultivo, se analizaron las células CD3<sup>+</sup> para determinar la expresión de CAR utilizando los anticuerpos anti-CD3 conjugados con FITC y anti-IgG1-Fc humanos conjugados con PE. Tal como se demostró, se llevó a cabo con éxito la transducción, y las células T expresan el CAR anti-CD30/CEA en la superficie celular en cantidades similares a las células T transducidas con el CAR anti-CD30 y anti-CEA, respectivamente.

Figura 3: se modificaron por ingeniería células T humanas con CAR, tal como se indica, con una tasa de expresión inicial de CAR de CAR anti-CEA: 22,2%; CAR anti-CD30: 28,9%; CAR anti-CEA/CD30: 22,8%. Se cultivaron las células T de CAR 300 horas en presencia de IL-2 y se monitorizaron las células que expresaban CAR. Las células T de CAR con un dominio de unión a CD30 se expanden de manera más eficaz que las células T con sólo el CAR anti-CEA.

Figura 4: células T humanas modificadas por ingeniería que expresan diferentes clases de CAR, tal como se indica (expresión inicial de CAR: CAR anti-CEA: 8,5%; CAR anti-CD30: 9,39%; CAR anti-CEA/CD30: 8,2%). Se incubaron conjuntamente células T de CAR (0,625-5x10<sup>4</sup> células/pocillo) durante 24 horas con células tumorales (2,5-5x10<sup>4</sup> células/pocillo), tal como se indica. Se usaron tres tipos diferentes de líneas de células que eran o bien positivas para CEA o bien para CD30, o control negativo tanto para CEA como para CD30. La línea de células que era negativa tanto para CEA como para CD30 no se lisó, mientras que se observó lisis específica de células LS174T, que es una línea de células CEA<sup>+</sup>/CD30<sup>-</sup>. En estas, las células T de CAR anti-CEA/CD30 demuestran una mayor lisis específica en comparación con las células T de CAR anti-CEA.

Figura 5: se muestra la liberación de interferón-gamma, un marcador para la activación de células T, durante el cultivo conjunto de diferentes números de células efectoras con las células tumorales. Después de 24 horas de cultivo conjunto, se recogieron los sobrenadantes y se analizaron para determinar interferón-gamma mediante ELISA. Se realizó el ensayo por triplicado y se determinó la DE. Tal como se muestra, las células T de CAR anti-CEA/CD30 produjeron IFN-gamma cuando se incubaron conjuntamente con las células LS174T CEA<sup>+</sup>/CD30<sup>-</sup>, así como con las células CEA<sup>-</sup> CD30<sup>+</sup>. No se produjo IFN-gamma tras la incubación conjunta con células Colo320 CEA<sup>-</sup> CD30<sup>-</sup>. Las células T con el CAR anti-CEA o el CAR anti-CD30 liberaron IFN-gamma sólo tras la incubación conjunta con células CEA<sup>+</sup> o CD30<sup>+</sup>, respectivamente.

Figura 6: la figura 6 muestra la actividad citolítica de células T CIK de CAR (células citolíticas inducidas por citocinas con fenotipo de células T NK). Se demuestra que se logra la destrucción potenciada de células diana CEA<sup>+</sup> CD30<sup>-</sup> usando las células T CIK de CAR anti-CEA/CD30. Las líneas de células tumorales son las mismas que las descritas en la figura 2.

Figura 7: la figura 7 demuestra la destrucción *in vivo* mejorada de células tumorales CEA<sup>+</sup> mediante células T de CAR anti-CEA/CD30 en comparación con las células T de CAR mono-específico anti-CEA. Se inyectaron conjuntamente dosis subterapéuticas de células T (2,5x10<sup>5</sup> células/ratón) sin CAR y células T modificadas por ingeniería o bien con el CAR anti-CEA/CD30 o bien con el CAR anti-CEA con células tumorales C15A3 CEA<sup>+</sup> CD30<sup>-</sup> (1x10<sup>6</sup> células/ratón) en ratones inmunodeficientes en Rag<sup>-/-</sup> y cadena gamma común<sup>-/-</sup>. Para su comparación, se

inyectaron células tumorales C15A3 sin células T (w/o). Se determinaron los volúmenes tumorales y el área bajo la curva (AUC). Se determinó la significación mediante la prueba de la t de Student. Se indicaron mediante asteriscos las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

5 Figura 8: la figura 8A muestra la representación esquemática de CAR anti-CD30 y el CAR biespecífico de CD25/CEA de SEQ ID NO: 18 codificado por la secuencia de SEQ ID NO: 17. Se cambió HRS3-scFv del CAR n.º 1457 por el scFv anti-CD25 RFT5. La estructura principal del CAR n.º 1576 resultante es idéntica al CAR n.º 1457  
10 mostrado en la figura 1. La figura 8B muestra la especificidad de la citotoxicidad. Se incubaron conjuntamente células T de CAR ( $0,625-5 \times 10^4$  células/pocillo) durante 24 horas con células tumorales CEA<sup>+</sup> o CEA<sup>-</sup> ( $2,5-5 \times 10^4$  células/pocillo), tal como se indica. Sólo las células T de CAR que expresaban el CAR biespecífico anti-CD30/CEA lisaron las células diana CEA<sup>+</sup>, mientras que las células T de CAR con el CAR biespecífico anti-CD25/CEA y las células T de CAR con un CAR mono-específico anti-CEA lisaron las dianas CEA<sup>+</sup> con menor eficiencia. Las células tumorales CEA<sup>-</sup> no se lisaron, lo que demuestra la especificidad para CEA<sup>-</sup> de las células T de CAR.

15 Figura 9: la figura 9A es una representación esquemática de la composición molecular de las moléculas de CAR con especificidad para CD30/MUC1 de SEQ ID NO: 20 codificado por la secuencia de SEQ ID NO: 19 y CD30/TAG-72 de SEQ ID NO: 22 codificado por la secuencia de SEQ ID NO: 21. Se usa B72.3 para el CAR anti-TAG-72. Excepto para el scFv anti-CEA, las moléculas son idénticas al CAR mostrado en la figura 1. La expresión en la superficie de las células de los CAR CD30/Muc1 y CD30/TAG-72 se demuestra en la figura 9B mediante citometría de flujo.  
20

### Descripción detallada de la presente invención

25 Los inventores tienen como objetivo proporcionar nuevos polipéptidos recombinantes, tal como se menciona en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que contienen al menos los siguientes dominios comenzando desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal: un primer dominio que contiene una unidad de anticuerpo anti-CD30 de cadena sencilla de HRS3-scFv de SEQ ID NO: 2 y una unidad de anticuerpo, siendo dicha unidad de anticuerpo específica de un antígeno presente en la superficie de una célula diana predeterminada que es específica de un antígeno asociado a tumor; opcionalmente, un dominio espaciador; un dominio transmembrana; y un dominio de señalización citoplásmica. Estos polipéptidos recombinantes representan péptidos de CAR biespecíficos. En una  
30 realización de la presente invención, estos polipéptidos de CAR se expresan por células T modificadas por ingeniería genética que contienen y eventualmente expresan estos polipéptidos de CAR.

35 Es decir, la presente invención se refiere a un polipéptido recombinante que tiene al menos los siguientes dominios comenzando desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal: un primer dominio que contiene una unidad de anticuerpo anti-CD30 de cadena sencilla de HRS3-scFv de SEQ ID NO: 2 y una unidad de anticuerpo, siendo dicha unidad de anticuerpo específica de un antígeno presente en la superficie de una célula diana predeterminada, en particular, siendo específica de un antígeno asociado a tumor; opcionalmente, un dominio espaciador; un dominio transmembrana; y un dominio de señalización citoplásmica según la reivindicación 2.  
40

45 Del mismo modo, la presente invención se refiere a los siguientes dominios, un primer dominio una unidad de anticuerpo, siendo dicha unidad de anticuerpo específica de un antígeno presente en la superficie de una célula diana predeterminada, y un segundo dominio que contiene una unidad de anticuerpo anti-CD30 de cadena sencilla; opcionalmente, un dominio espaciador; un dominio transmembrana; y un dominio de señalización citoplásmica.  
50

Tal como se usa en el presente documento, el término “comprende” o “que comprende”, así como los términos “contiene” o “que contiene”, incluyen la realización de “consiste” o “que consiste”.

55 El término “homólogo”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas, ya sean ADN o polipéptidos, que tienen una homología de secuencia de una determinada cantidad, concretamente, de al menos el 95%, como al menos el 96%, el 97%, el 98%, el 99% de la secuencia de ácido nucleico o la secuencia de aminoácidos a la que se refiere. La homología se refiere a la magnitud de identidad entre dos secuencias. Las secuencias homólogas tienen las mismas características o similares, en particular, tienen la misma propiedad o similar de la secuencia que se identifica. Por ejemplo, el homólogo de la secuencia de HRS3-scFv de SEQ ID NO: 2 tiene la misma especificidad de unión o similar que la molécula de CD30, como es el caso de la molécula de HRS3-scFv. Además, los homólogos incluyen moléculas de ácido nucleico que codifican para el mismo péptido pero pueden variar en su secuencia debido a la degeneración del código genético. Además, “identificar” se refiere a la presencia de moléculas de aminoácido o ácido nucleico idénticas en orden tal como se describe para la secuencia a la que se refiere. Es decir, en el caso de al menos el 90% de identidad, el 90% o más de las moléculas de ácido nucleico y aminoácido, respectivamente, son idénticas en las posiciones respectivas. A menos que se identifique lo contrario, los términos “homología” e “identidad” se usan de manera intercambiable en el presente documento. En particular, el homólogo de la secuencia de HRS3-scFv de SEQ ID NO: 2 incluye unidades de anticuerpo anti-CD30 de cadena sencilla que se unen al mismo epítipo reconocido por HRS3-scFv.  
60

65 Además, el término “modificadas por ingeniería genética” se refiere a que las células se manipulan mediante ingeniería genética. Es decir, las células contienen una secuencia heteróloga que no se produce de manera natural

5 en dichas células. Normalmente, la secuencia heteróloga se introduce a través de un sistema de vectores u otros medios para introducir moléculas de ácido nucleico en las células, incluyendo liposomas. La molécula de ácido nucleico heteróloga puede integrarse en el genoma de dichas células o puede estar presente de manera extracromosómica, por ejemplo, en forma de plásmidos. El término también incluye realizaciones de introducir polipéptidos de CAR aislados, modificados por ingeniería genética, en la célula.

10 Generalmente, los CAR son proteínas de fusión que consisten en un dominio de reconocimiento de tipo anticuerpo extracelular fusionado a proteínas de señalización de células T intracelulares. Normalmente, el ectodominio que contiene la región de reconocimiento de antígeno comprende un péptido señal y una unidad de reconocimiento de antígeno. Según la presente invención, el ectodominio comprende una unidad anti-CD30 de cadena sencilla en combinación con una unidad de anticuerpo que es específica de un antígeno presente en la superficie de una célula diana predeterminada, en particular, que es específica de un antígeno asociado a tumor. La unidad de cadena sencilla es una unidad de cadena sencilla de HRS3-scFv de SEQ ID NO: 2. Es decir, la unidad anti-CD30 de cadena sencilla es una unidad de cadena sencilla que es específica del epítipo de la molécula de CD30 reconocida por la unidad anti-CD30 de cadena sencilla de HRS3-scFv de SEQ ID NO: 2.

20 El ectodominio puede estar espaciado del dominio transmembrana por la presencia de un dominio espaciador. Dicho dominio espaciador opcional une el dominio de unión a antígeno al dominio transmembrana, y se prefiere que dicho dominio transmembrana sea lo suficientemente flexible como para permitir que el dominio de unión a antígeno se oriente en direcciones diferentes para facilitar el reconocimiento de antígeno.

El dominio transmembrana es normalmente una hélice alfa hidrófoba que atraviesa la membrana. Finalmente, el endodominio representa el dominio de señalización en el citoplasma de las células.

25 Además, el término "unidad de anticuerpo que es específica de un antígeno presente en la superficie de una célula diana predeterminada" se refiere al sitio de unión derivado de un anticuerpo de cualquier especie, o bien en forma de una sola cadena de polipéptido o bien múltiples cadenas de polipéptido asociadas de manera covalente o no covalente. Estos dominios se caracterizan por la unión específica a una molécula en la superficie de una célula diana. Alternativamente, puede usarse cualquier otro resto de unión distinto de un anticuerpo como dominio de direccionamiento en un CAR, por ejemplo, el resto de unión de un receptor, como un receptor de citocinas.

30 Además, el término "unidad de anticuerpo que es específica de un antígeno asociado a tumor" se refiere a un dominio de unión con especificidad para una molécula diana presente en la superficie celular expresada por células tumorales y que se compone de un polipéptido, un hidrato de carbono o un lípido, o combinaciones de los mismos, que se expresa de manera exclusiva o preferente por células malignas.

40 El término "CAR funcional" se refiere a un CAR expresado por células inmunitarias que, mediante la unión específica a la molécula diana relacionada, activa la propia célula inmunitaria para aumentar la biosíntesis de proteínas, la secreción de citocinas, la proliferación celular y la lisis de células diana.

Además, el término "células CD30<sup>+</sup>" o "células cancerosas CD30<sup>+</sup>" se refiere a células (ya sean células no cancerosas o cancerosas) que expresan en su superficie la molécula de CD30.

45 Los términos "células no tumorales" y "células tumorales", así como "células no cancerosas" y "células cancerosas", se usan de manera intercambiable en el presente documento, a menos que se defina lo contrario.

50 El término "células T CIK" o "células T NK", que se usan de manera intercambiable en el presente documento, se refiere a un grupo heterogéneo de células T que comparten propiedades tanto de células T como de linfocitos citolíticos naturales (NK). Las células T CIK de CAR se obtienen mediante técnicas de cultivo conocidas para obtener, en primer lugar, células T NK o células T CIK y, después de eso, modificar por ingeniería las propias células con el CAR mediante métodos conocidos.

55 El polipéptido recombinante según la presente invención representa un CAR biespecífico, también identificado en el presente documento como CAR específico dual. En una realización, el orden en el primer dominio es, desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal: i) una unidad de anticuerpo anti-CD30 de cadena sencilla y una unidad de anticuerpo, siendo dicha de anticuerpo específica de un antígeno presente en la superficie de una célula diana predeterminada, o ii) una unidad de anticuerpo, mediante lo cual dicha unidad de anticuerpo es específica de un antígeno presente en la superficie de una célula diana predeterminada, y una unidad de anticuerpo anti-CD30 de cadena sencilla.

60 Se prefiere que la unidad de anticuerpo que es específica de un antígeno presente en la superficie de una célula diana predeterminada sea una unidad de anticuerpo que es específica de un antígeno asociado a tumor.

65 En una realización de la presente invención, el CAR presente en la célula T comprende una secuencia líder que se ubica de manera N-terminal con respecto al primer dominio que contiene la unidad de cadena sencilla anti-CD30 y la unidad de anticuerpo.

Además, en otra realización, la unidad de anticuerpo anti-CD30 de cadena sencilla es un péptido HRS3-scFv, en particular, de SEQ ID NO: 2, por ejemplo, codificado por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1. En el presente documento se ha reconocido que un fragmento de anticuerpo anti-CD30 de cadena sencilla de la región variable (scFv), en particular, de HRS3, permite mostrar la actividad deseada. En una realización, el fragmento de anticuerpo anti-CD30 de cadena sencilla es un fragmento que reconoce y se une al epítipo de HRS-scFv.

En otra realización, el dominio espaciador de la molécula de CAR es un dominio CH2CH3 bisagra de IgG1 de SEQ ID NO: 6 u homólogos del mismo, que tiene al menos el 95% de identidad con el mismo, preferiblemente, el dominio espaciador es un dominio CH2CH3 bisagra de IgG1 mutado según SEQ ID NO: 6, por ejemplo, codificado por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 5.

En algunas realizaciones, puede ubicarse un ligador entre el dominio espaciador y el dominio transmembrana.

Además, otra realización se refiere a una célula T con un receptor de antígeno quimérico en el que el dominio transmembrana se deriva de la molécula de CD28, por ejemplo, el dominio transmembrana de la molécula de CD28 que carece del dominio Ick de SEQ ID NO: 8, por ejemplo, codificado por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 7.

El dominio de señalización o endodominio o dominio intracelular, que se usan de manera intercambiable en el presente documento, contiene un CD3 zeta o una cadena de señalización de la cadena gamma del receptor de FcÉpsilon o un dominio coestimulador, o tanto CD3zeta como un dominio coestimulador o tanto la cadena gamma del receptor de FcÉpsilon como un dominio coestimulador. Por ejemplo, el dominio intracelular es un dominio de señalización CD3 zeta de SEQ ID NO: 10, por ejemplo, codificado por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 9, o un homólogo del mismo que tiene al menos el 95% de homología. En otra realización, el dominio intracelular es el dominio de señalización gamma del receptor de Fc de IgE de SEQ ID NO: 12, por ejemplo, codificado por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 11, o un homólogo del mismo que tiene al menos el 95% de identidad. El dominio de señalización es responsable de la activación de las células T, en particular, de la actividad citotóxica y de la liberación de citosinas, incluyendo la secreción de interferón-gamma.

La molécula de CAR puede ser una molécula de CAR de la denominada segunda generación. Las moléculas de CAR de segunda generación tienen dominios de señalización mejorados que contienen adicionalmente un segundo dominio de señalización (coestimulador), por ejemplo, derivado de CD28, CD134 (OX40) o CD137 (4-1BB). Las moléculas de CAR de tercera generación contienen un dominio de señalización coestimulador combinado, por ejemplo, CD28 combinado con CD137 o CD134.

Una visión general sobre las moléculas de CAR se proporciona, por ejemplo, en Gilham D.E. *et al.*, *Trans. and Molecular Medicine*, 2012, 18(7), 377-384.

En una realización preferida de la presente invención, la célula T es una célula T con un receptor de antígeno quimérico, en la que el receptor de antígeno quimérico es un polipéptido de SEQ ID NO: 14, por ejemplo, codificado por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 13. Dicho CAR también se denomina en el presente documento n.º 1457.

El CAR anti-CD30 anti-CEA n.º 1457 se expresa en la superficie de células T y se compone de la parte extracelular del fragmento de anticuerpo anti-CD30 de cadena sencilla de la región variable (scFv) HRS3, el anticuerpo BW431/26-scFv correspondiente a SEQ ID NO: 4, por ejemplo, codificado por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 3, correspondiente al anticuerpo anti-CEA BW431/26, y el dominio CH2CH3 de IgG1 humana modificado como espaciador entre scFv y el dominio transmembrana. La modificación del dominio de IgG1 consiste en mutaciones puntuales para convertir la secuencia de aminoácidos de tipo natural PELLGGP X<sub>13</sub> MISRT (SEQ ID NO: 15) en PPVA-GP X<sub>13</sub> MIART (SEQ ID NO: 16), que reduce la unión imprevista del dominio Fc de CAR a los receptores de Fc en otras células, como células inmunitarias innatas, que mediarían en su activación. La parte proximal a la membrana intracelular y transmembrana de CAR n.º 1457 se deriva de CD28 humano y se fusiona con la parte intracelular de CD3zeta humano. La secuencia de CD28 está mutada en P560 > A560, P563 > A563, P564 > A564 (Kofler *et al.*, *Mol. Ther.* 19, 760 - 767 (2011)). Por tanto, se destruye el sitio de unión a CD28 para la Ick cinasa con la consecuencia de que se evitan la activación de la ruta de señalización de Ick y la posterior secreción de IL-2 mediada por CAR. Los modelos preclínicos implican que, en estas condiciones, se reduce la represión mediada por células Treg de las funciones efectoras de las células T de CAR.

Como ejemplo, el polipéptido recombinante es el polipéptido de SEQ ID NO: 14, por ejemplo, codificado por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 13, que corresponde al CAR n.º 1457 mostrado en la figura 1.

En otra realización, el polipéptido recombinante es un polipéptido en el que la unidad de anticuerpo se une a un antígeno asociado a tumor, incluyendo uno cualquiera de antígeno carcinoembrionario (CEA), CA19-9, CA72-4 también conocido como TAG-72, PSCA, Muc-1, HMW-MAA, melanotransferrina p97, receptor de acetilcolina fetal, ErbB2 (Her2/neu), proteína de resistencia a múltiples fármacos (MDR), CD19, CD20, TOSO.

Por ejemplo, el CAR n.º 1457 de SEQ ID NO: 14 corresponde a un polipéptido en el que la unidad de anticuerpo es específica de CEA. Además, los CAR útiles según la presente invención se muestran en la figura 9, concretamente, CAR de CD30/MUC-1 o CAR de CD30/Tag72. Estos CAR son el n.º 1587, anti-CD30/MUC1, de SEQ ID NO: 20, codificado por la secuencia de SEQ ID NO: 19, y el n.º 1650, anti-CD30/TAG-72, de SEQ ID NO: 22, codificado por la secuencia de SEQ ID NO: 21.

Tal como se demuestra en los ejemplos, las células T (ya sean células T de CD4 o de CD8) o las células CIK demuestran la lisis específica de células que no expresan CD30 pero que expresan el antígeno al que sólo se une específicamente la unidad de anticuerpo. Es decir, sorprendentemente, el porcentaje de lisis específica es mayor con la molécula de CAR biespecífica en comparación con la molécula mono-específica que sólo contiene la unidad de unión a anticuerpo específica del antígeno presente en la superficie de la célula diana predeterminada.

La célula diana es una célula tumoral.

Además, la célula diana predeterminada puede ser una célula implicada en defectos autoinmunitarios en un sujeto. En ese caso particular, se modifican las células supresoras, en particular las células T reguladoras, con el CAR descrito con el fin de reprimir la reacción inmunitaria inflamatoria aguda en el tejido seleccionado como diana. El CAR se une al antígeno tisular con un scFv, por ejemplo, anti-HLA B27, y a CD30 con el otro scFv.

Aunque no se expresa por las células diana predeterminadas, la unidad de anticuerpo anti-CD30 de cadena sencilla presente en la molécula de CAR aumenta la lisis específica de las células diana. Además, se ha demostrado sorprendentemente que, en el caso de células negativas para CD30, puede aumentarse el porcentaje de lisis específica tal como se demuestra en los ejemplos. Esto no sólo es cierto para la lisis por CAR que expresa células T, sino también por células CIK de CAR. Se considera que la autoestimulación de las células T de CAR permite aumentar la lisis específica de las células diana.

Además, la presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico que comprenden la secuencia de ácido nucleico que codifica para el polipéptido según la presente invención. Además, se proporcionan vectores que comprenden la secuencia de ácido nucleico según la presente invención que codifica para el polipéptido que se describe. El experto conoce bien vectores y sistemas de vectores adecuados y, en particular, vectores que permiten la transfección y transducción de células eucariotas, en particular, células T. Por ejemplo, el vector es un vector viral.

Además, la presente invención proporciona una célula aislada, una línea de células o una célula huésped que contiene el vector según la presente invención o una molécula de ácido nucleico según la presente invención. Preferiblemente, dicha célula, línea de células o célula huésped es una célula T aislada, por ejemplo, una célula T CD4<sup>+</sup> o una célula T CD8<sup>+</sup>.

Además, se describe un kit o sistema que contiene el vector según la presente invención, la célula, la línea de células o la célula huésped según la presente invención, o el polipéptido según la presente invención o una molécula de ácido nucleico según la presente invención, o mezclas de los mismos, para su uso en la producción de células T que expresan el receptor de antígeno quimérico. El kit o sistema puede contener componentes adicionales, incluyendo medios para introducir el vector, el polipéptido o las moléculas de ácido nucleico en las células. El experto conoce bien medios adecuados para hacerlo.

Además, en el presente documento se proporcionan células T, como células T CD8 y/o CD4, que expresan en su superficie receptores de antígeno quiméricos que tienen en el dominio extracelular una unidad de anticuerpo, siendo dicha unidad de anticuerpo específica de un antígeno asociado a tumor y/o siendo específica de un antígeno viral presente en la superficie para un antígeno presente en la superficie de una célula diana predeterminada, y una unidad de anticuerpo anti-CD30 de cadena sencilla expresada por dichas células. Las unidades pueden estar presentes o bien en un único polipéptido, por ejemplo, un polipéptido tal como se define en el presente documento, o bien, alternativamente, pueden estar presentes en receptores de antígeno quiméricos diferentes.

En otro aspecto, el linfocito puede ser una célula T CIK de CAR, tal como se define en el presente documento.

Los linfocitos (células T), incluyendo las células T CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> o CIK, demuestran una mayor lisis específica de las células diana, reduciendo de ese modo los efectos secundarios y, además, superando el problema de rendimiento insuficiente en la unión antitumoral debido a diversos motivos, por ejemplo, una amplificación y una actividad citotóxica menores después de la transferencia adoptada al paciente.

Se considera que la presencia de la unidad de anticuerpo anti-CD30 de cadena sencilla permite amplificar los linfocitos modificados por ingeniería genética y mejorar la persistencia de los mismos, superando de ese modo el problema de rendimiento insuficiente.

Las células son particularmente útiles en el tratamiento de cáncer, en particular cáncer CD30<sup>-</sup>, mediante lo cual dicho cáncer es un cáncer que expresa en las células cancerosas el antígeno al que se dirige el anticuerpo del

antígeno antitumoral.

En un aspecto adicional, se da a conocer el uso de células T con un receptor de antígeno quimérico según la presente invención en terapia adaptativa con células para tratar cáncer CD30<sup>-</sup> o CD30<sup>+</sup> en un sujeto que lo necesita. Por ejemplo, el cáncer CD30<sup>+</sup> puede ser linfoma de Hodgkin, linfoma anaplásico de células grandes, leucemia linfocítica aguda, linfoma cutáneo, micosis fungoide, enfermedades linfoproliferativas, mastocitosis sistémica, teratocarcinoma, tumores malignos derivados de células madre, o células madre cancerosas u otras. En particular, la invención se refiere al uso de tales células inmunitarias para el tratamiento de cánceres CD30<sup>-</sup>, por ejemplo, de mama, de pulmón, de próstata, de páncreas, carcinomas gastrointestinales, cáncer neuronal y otros. Por tanto, la presente invención puede fomentar la terapia inmunitaria adaptativa mediante células T de CAR.

La presente invención se describe además por medio de ejemplos. Dichos ejemplos ilustran la invención adicionalmente sin limitarla a los mismos.

## 15 Ejemplos

Preparación de CAR n.º 1457

Se generó el casete de expresión del CAR biespecífico anti-CD30/CEA de la siguiente manera: Se amplificaron por PCR el scFv anti-CD30 (HRS3) y el scFv anti-CEA (BW431/26) y se flanquearon con un ligador mediante secuencias solapantes en el extremo 3' terminal de CD30-scFv y el extremo 5' terminal de scFv anti-CEA mientras que el ligador codificada para un ligador (Gly(4)-Ser(1))<sub>5</sub> de 40 AA. Se ensamblaron los ADN de los scFv mediante SOE-PCR, se digirieron con NcoI y BamHI y se ligaron en el sitio NcoI/BamHI del vector retroviral pBullet-HRS3-scFv-Fc-CD28deltaIck-zeta, reemplazando de ese modo el HRS3-scFv por el HRS3scFv-BW431/26scFv combinado. El vector resultante que codifica para el CAR biespecífico anti-CD30/CEA se denominó n.º 1457. Las composiciones modulares del CAR n.º 1457 y sus equivalentes mono-específicos anti-CEA (n.º 946) y anti-CD30 (n.º 1138) se muestran esquemáticamente en la figura 1.

Se produjo el vector retroviral que codifica para el CAR n.º 1457 según SOP-GL-VectProd usando una envuelta pseudotipada de Galv. En resumen, se realizó de manera transitoria la producción de partículas de vectores en la línea de células de riñón embrionarias humanas 293T después de la transfección de ADN mediada por Polyfect®. Se pseudotiparon las partículas de vectores con Galv. No se determinó el título de los vectores.

Se realizó la transducción de linfocitos sanguíneos humanos según técnicas convencionales SOP. En resumen, se transdujeron linfocitos humanos con un sobrenadante de 2 días a partir de células 293T transfectadas durante 2 días. Se expresó el CAR n.º 1457 por el 20-35% de células T humanas, tal como se midió el día 2 mediante citometría de flujo usando un anticuerpo dirigido al dominio constante extracelular CH2 CH3 de IgG1 del CAR.

Pueden registrarse las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> que expresan el CAR n.º 1457 en la superficie celular mediante el uso del anticuerpo 9G10 que se une específicamente al dominio HRS3-scFv del CAR. Las células T modificadas por ingeniería con el CAR n.º 1457 se unen específicamente a células que expresan CD30 y se activan, indicado por el aumento de secreción de citocinas incluyendo IFN- $\gamma$ , por el aumento de la proliferación y de la citólisis de células diana CD30<sup>+</sup>. Cabe destacar que sólo se secretan niveles de fondo de IL-2 cuando las células T se estimulan por el CAR. Sin embargo, IL-2 se secreta en cantidades fisiológicas cuando las células T se estimulan por su TCR fisiológico y CD28. La activación de las células T de n.º 1457 es específica de antígeno tal como se define por la especificidad del CAR, dado que las células CD30<sup>-</sup> no desencadenan la activación de células T. El CD30 soluble, que se acumular en el suero de pacientes con linfoma CD30<sup>+</sup>, no bloquea la activación de células T mediada por CAR en concentraciones de hasta 10  $\mu$ g/ml [Hombach A, *et al.*, Cancer Res. 15 de marzo de 1998; 58(6):1116-9]. Esto se debe al hecho de que el CAR debe reticularse mediante la unión de múltiples copias del antígeno dirigido con el fin de desencadenar la activación de células T, que sólo puede producirse cuando CD30 se inmoviliza o expresa en la superficie de células diana pero no se produce cuando la proteína CD30 está presente en disolución.

Ejemplo 1: actividad de células T modificadas con CAR específico dual hacia líneas de células CEA<sup>+</sup> y/o CD30<sup>+</sup>

Se realizó la modificación por ingeniería de células T con CAR n.º 1457 tal como se describió anteriormente. Se detectó el CAR en la superficie de células T mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo contra el dominio Fc en el resto extracelular del CAR (figura 1, 2). Se expresó el CAR anti-CEA/CD30 con una eficiencia similar a los CAR mono-específicos con el dominio de unión o bien de CD30 o bien de CEA. Para someter a prueba la especificidad dual del CAR n.º 1457, se incubaron conjuntamente células T injertadas con células diana o bien CD30<sup>+</sup> o bien CEA<sup>+</sup> y se monitorizaron la citotoxicidad redirigida y la secreción de IFN-gamma. Mientras que las células T con CAR anti-CEA y anti-CD30 sólo se activaron por células diana CEA<sup>+</sup> o CD30<sup>+</sup>, respectivamente, el CAR biespecífico activa las células T después del cultivo conjunto con células tumorales tanto CEA<sup>+</sup> CD30<sup>-</sup> como CEA<sup>-</sup> CD30<sup>+</sup>. La activación de células T da como resultado la lisis específica de células diana y la secreción de IFN-gamma (consúltese la figura 4, 5 y el ejemplo 3).

Conclusión:

Las células T con el CAR n.º 1457 presentan especificidad dual de unión, es decir, para CD30 y CEA. Las células T que expresan el CAR biespecífico se activaron mediante el acoplamiento de las células diana con un único antígeno de CAR relacionado así como mediante células diana con ambos antígenos.

5

Ejemplo 2: expansión específica de células T modificadas con CAR n.º 1457

Se modificaron por ingeniería células T con el CAR n.º 1457 o, para su comparación, con el CAR mono-específico de CD30 o CEA correspondiente, respectivamente, y se cultivaron en presencia de IL-2 (400 U/ml). El número inicial de células T CAR<sup>+</sup> fue del 20-30%. Se sometieron a prueba las células en diferentes puntos de tiempo para determinar la expresión de CAR mediante citometría de flujo. Tal como se resume en la figura 3, el número de células T con el CAR anti-CD30 y el CAR anti-CEA/CD30 n.º 1457 aumentó hasta el 90% de células T durante el cultivo, mientras que el número de células T de CAR anti-CEA no superó el 50%.

10

15 Conclusión:

Los datos demuestran que las células T de CAR con el dominio de unión a CD30 se expanden más en comparación con las células T de CAR con un dominio de unión a CEA. El efecto superior también está presente cuando el dominio de unión anti-CD30 se une con el dominio de unión anti-CEA.

20

Ejemplo 3: lisis específica aumentada por células T modificadas por ingeniería con CAR n.º 1457 y células T CIK modificadas por ingeniería con CAR n.º 1457 hacia células diana negativas para CD30

(a) Células T

25

Se modificaron por ingeniería células T humanas para expresar el CAR n.º 1457, el CAR específico de CEA y el CAR específico de CD30, respectivamente. Se incubaron conjuntamente el mismo número de células T de CAR con células tumorales que expresan o bien CEA o bien CD30, o ambos. Los datos presentados en la figura 4 muestran que la línea celular que es negativa tanto para CEA como para CD30 (Colo320) no se lisó, mientras que se observó lisis específica de células LS174T, que es una línea de células CEA<sup>+</sup>/CD30<sup>-</sup>. En este caso, las células T de CAR anti-CEA/CD30 demuestran una mayor lisis específica en comparación con las células T de CAR anti-CEA.

30

La actividad citolítica está acompañada por la liberación de IFN- $\gamma$ , un marcador para la activación de las células T, tal como se muestra en la figura 5. Las células T de CAR anti-CEA/CD30 n.º 1457 produjeron IFN-gamma cuando se incubaron conjuntamente con las células LS174T CEA<sup>+</sup>/CD30<sup>-</sup> así como con las células CEA<sup>-</sup> CD30<sup>+</sup>. No se produjo IFN-gamma tras la incubación conjunta con células Colo320 CEA<sup>-</sup> CD30<sup>-</sup>. Las células T con el CAR anti-CEA o el CAR anti-CD30 liberaron IFN-gamma sólo tras la incubación conjunta con células CEA<sup>+</sup> o CD30<sup>+</sup>, respectivamente.

35

(b) Células CIK

40

Se generaron células CIK según procedimientos convencionales y se modificaron por ingeniería con el CAR anti-CD30/CEA n.º 1457. Después de 8 días tras la transducción, se cultivaron conjuntamente células CIK de CAR n.º 1457 con células diana CD30<sup>-</sup> CEA<sup>+</sup>, CD30<sup>-</sup> CEA<sup>-</sup> o CD30<sup>+</sup> CEA<sup>-</sup> y se registró la lisis de células diana. Las células CIK que expresan el CAR mono-específico anti-CD30 y anti-CEA correspondiente, respectivamente, sirvieron como control. Las células T de CAR biespecífico anti-CD30/CEA y mono-específico anti-CD30 lisaron las células diana CD30<sup>+</sup> con una eficiencia similar. En cambio, las células CIK de CAR n.º 1457 lisaron las células diana CEA<sup>+</sup> CD30<sup>-</sup> de manera más eficiente que las células CIK con el CAR anti-CEA (figura 6). Los datos indican que, sorprendentemente, las células CIK de CAR n.º 1457 muestran una mayor actividad citolítica contra células tumorales que no expresan CD30 que las células CIK con un CAR específico de CEA.

50

Conclusión:

Las células T y las células CIK modificadas por ingeniería con el CAR n.º 1457 muestran una reactividad antitumoral potenciada contra células diana, ambas que expresan y que carecen de CD30, en comparación con las células T con el CAR mono-específico. Esto es inesperado, en particular para aquellas células diana que carecen de CD30.

55

Ejemplo 4: actividad antitumoral mejorada de células T de CAR n.º 1457 en un modelo de xenoinjerto de ratón.

Se monitorizó la actividad *in vivo* de células T de CAR anti-CD30/CEA n.º 1457 en ratón inmunodeficiente en Rag<sup>-/-</sup> y cadena gamma común<sup>-/-</sup>. Se modificaron por ingeniería células T de CAR anti-CEA y CAR anti-CD30/CEA n.º 1457 tal como se describió anteriormente, y se inyectaron conjuntamente por vía subcutánea en una dosis subterapéutica (2,5x10<sup>5</sup> células T de CAR/animal) con células tumorales C15A3 CEA<sup>+</sup> CD30<sup>-</sup> (1x10<sup>6</sup> células/animal), que se transfectaron para expresar CEA humano, en ratones. Se usaron ratones sin células T y con células T sin modificar como control y se monitorizó el crecimiento tumoral cada 2º-3º día. Se determinaron las curvas de crecimiento (figura 7A) y el área bajo la curva (figura 7B). Mientras que las células T de CAR anti-CEA produjeron un ligero retardo del crecimiento tumoral, las células T de CAR anti-CD30/CEA ralentizaron significativamente el crecimiento

60

65

tumoral, lo que indica una mayor actividad anti-CEA de las células T de CAR biespecífico n.º 1457 *in vivo* que las células T con el CAR anti-CEA.

Conclusión:

5 Las células T de CAR biespecífico anti-CD30/CEA son más eficaces en una respuesta antitumoral prolongada contra células tumorales CEA<sup>+</sup> CD30<sup>-</sup> *in vivo* en comparación con las células T con el CAR mono-específico anti-CEA. La reactividad antitumoral mejorada se debe al particular diseño de CAR porque CD30 humano no se expresa por el huésped murino ni por las células tumorales de ratón injertadas, y no se reconoce en células tumorales o en células del huésped.

Ejemplo 5: actividad antitumoral mejorada de CAR anti-CD30/CEA n.º 1457 pero no de CAR anti-CD25-CEA n.º 1576.

15 Se generó el CAR biespecífico n.º 1576 de SEQ ID NO: 18 codificado por la secuencia de SEQ ID NO: 17 con especificidad tanto para el antígeno de activación de linfocitos CD25 como para CEA sustituyendo el HRS3-scFv por el de scFv anti-CD25 RFT5 (figura 8A; véase la figura 1). Se realizó la modificación por ingeniería de células T con CAR n.º 1576 tal como se describió anteriormente flanqueando el ADNc para el scFv anti-CD25 con secuencias solapantes y secuencias para las enzimas de restricción apropiadas mediante PCR. Se substituyó la secuencia del HRS3-scFv y se expresó el CAR n.º 1576 resultante mediante transducción con sobrenadante retroviral según SOP de transducción. Se detectó el CAR en la superficie de las células T mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo contra el dominio Fc en el resto extracelular del CAR. Se expresó el CAR anti-CD25/CEA con una eficiencia similar a los CAR anti-CD30 mono-específico y biespecífico, respectivamente. Se sometieron a prueba la activación de células T de CAR específico y la lisis de células diana CEA<sup>+</sup> mediante cultivo conjunto con células tumorales CEA<sup>+</sup> y CEA<sup>-</sup>, respectivamente. Todos los CAR lisaron específicamente células diana CEA<sup>+</sup>, pero el CAR anti-CD30/CEA lisó células tumorales con una mayor eficiencia que los CAR anti-CEA mono-específico y biespecífico y anti-CD25/CEA, respectivamente (figura 8B).

Conclusión:

30 Las células T con el CAR anti-CD30/CEA n.º 1457 pero no con el CAR anti-CD25/CEA n.º 1576 se activaron contra células diana CEA<sup>+</sup> con una mayor eficiencia que las células T de CAR mono-específico anti-CEA.

Ejemplo 6: anticuerpos biespecíficos anti-CD30 con segunda especificidad diferente

35 Se generaron moléculas de CAR biespecíficas anti-CD30 tal como se describió en el ejemplo 1, excepto por la sustitución del resto de scFv anti-CEA por restos de scFv con especificidad contra MUC1, C595-scFv, que dio como resultado el CAR anti-CD30/MUC1 n.º 1587, y con especificidad contra TAG-72, B72.3-scFv, que dio como resultado el CAR anti-CD30/TAG-72 n.º 1650. Las secuencias de los mismos son las SEQ ID NO: 20 y 19 para n.º 1587 y las SEQ ID NO: 22 y 21 para n.º 1650.

La figura 9A es una representación esquemática de estos CAR biespecíficos. La figura 9B demuestra la expresión de estas moléculas de CAR en células 293T transfectadas.

45 **Lista de secuencias**

<110> Universitaet zu Koeln

<120> Receptor de antígeno quimérico y su uso

50 <130> 4677-005 PCT-1

<150> documento EP14177278.0

55 <151> 16-07-2014

<160> 22

<170> PatentIn versión 3.5

60 <210> 1

<211> 756

<212> ADN

<213> humano

65 <220>

<221> CDS

ES 2 833 162 T3

<222> (1)..(756)

<400> 1

aga atg gcc cag gtg caa ctg cag cag tca ggg gct gag ctg gct aga	48
Arg Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg	
1 5 10 15	
cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttt	96
Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
20 25 30	
act acc tac aca ata cac tgg gta aga cgg agg cct gga cac gat ctg	144
Thr Thr Tyr Thr Ile His Trp Val Arg Arg Arg Pro Gly His Asp Leu	
35 40 45	
gaa tgg att gga tac att aat cct agc agt gga tgt tct gac tac aat	192
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Cys Ser Asp Tyr Asn	
50 55 60	
caa aac ttc aag ggc aag acc aca ttg act gca gac aag tcc tcc aac	240
Gln Asn Phe Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn	
65 70 75 80	
aca gcc tac atg caa ctg aac agc ctg aca tct gag gac tct gcg gtc	288
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val	
85 90 95	
tat tac tgt gca aga aga gcg gac tat ggt aac tac gaa tat acc tgg	336
Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr Glu Tyr Thr Trp	
100 105 110	
ttt gct tac tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca agt gga	384
Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ser Gly	
115 120 125	
ggc ggt tca ggt gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcg gtc atc gag	432
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Val Ile Glu	
130 135 140	
5 ctc act cag tct cca aaa ttc atg tcc aca tca gta gga gac agg gtc	480

ES 2 833 162 T3

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

aac gtc acc tac aag gcc agt cag aat gtg ggt act aat gta gcc tgg 528  
 Asn Val Thr Tyr Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp  
 165 170 175

ttt caa caa aaa cca ggg caa tct cct aaa gtt ctg att tac tcg gca 576  
 Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Val Leu Ile Tyr Ser Ala  
 180 185 190

tct tac cga tac agt gga gtc cct gat cgc ttc aca ggc agt gga tct 624  
 Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser  
 195 200 205

gga aca gat ttc act ctc acc atc agc aat gtg cag tct gaa gac ttg 672  
 Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu  
 210 215 220

gca gag tat ttc tgt cag caa tat cac acc tat cct ctc acg ttc gga 720  
 Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr His Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly  
 225 230 235 240

ggg ggc acc aag ctg gaa atc aaa cgg tca gat ccc 756  
 Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ser Asp Pro  
 245 250

<210> 2  
 <211> 252  
 <212> PRT  
 <213> humano

5

<400> 2

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

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 20 25 30

Thr Thr Tyr Thr Ile His Trp Val Arg Arg Arg Pro Gly His Asp Leu  
 35 40 45

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Cys Ser Asp Tyr Asn  
 50 55 60

Gln Asn Phe Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn  
 65 70 75 80

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr Glu Tyr Thr Trp  
 100 105 110

10

ES 2 833 162 T3

Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ser Gly  
 115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Val Ile Glu  
 130 135 140

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

Asn Val Thr Tyr Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp  
 165 170 175

Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Val Leu Ile Tyr Ser Ala  
 180 185 190

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

Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu  
 210 215 220

Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr His Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly  
 225 230 235 240

Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ser Asp Pro  
 245 250

<210> 3  
 <211> 734  
 5 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> péptido sintético

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(732)

15 <400> 3

ggg gtc cac tcc cag gtc caa ctg cag gag tca ggt cca ggt ctt gtg	48
Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val	
1 5 10 15	
aga cct agc cag acc ctg agc ctg acc tgc acc gtg tct ggc ttc acc	96
Arg Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Thr	
20 25 30	
atc agc agt ggt tat agc tgg cac tgg gtg aga cag cca cct gga cga	144
Ile Ser Ser Gly Tyr Ser Trp His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg	
35 40 45	
ggg ctt gag tgg att gga tac ata cag tac agt ggt atc act aac tac	192

ES 2 833 162 T3

Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Gln	Tyr	Ser	Gly	Ile	Thr	Asn	Tyr		
50						55					60						
aac	ccc	tct	ctc	aaa	agt	aga	gtg	aca	atg	ctg	gta	gac	acc	agc	aag		240
Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Met	Leu	Val	Asp	Thr	Ser	Lys		
65					70					75					80		
aac	cag	ttc	agc	ctg	aga	ctc	agc	agc	gtg	aca	gcc	gcc	gac	acc	gcg		288
Asn	Gln	Phe	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala		
				85					90						95		
gtc	tat	tat	tgt	gca	aga	gaa	gac	tat	gat	tac	cac	tgg	tac	ttc	gat		336
Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	Asp	Tyr	Asp	Tyr	His	Trp	Tyr	Phe	Asp		
			100					105						110			
gtc	tgg	ggc	caa	ggg	acc	acg	gtc	acc	gtc	tcc	tca	gga	ggg	ggg	gga		384
Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly		
		115					120					125					
tcg	ggc	ggg	ggc	ggg	tcg	ggg	ggc	ggc	gga	tct	gac	atc	cag	ctg	acc		432
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Gln	Leu	Thr		
	130					135					140						
cag	agc	cca	agc	agc	ctg	agc	gcc	agc	gtg	ggg	gac	aga	gtg	acc	atc		480
Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile		
	145				150					155					160		
acc	tgt	agt	acc	agc	tcg	agt	gta	agt	tac	atg	cac	tgg	tac	cag	cag		528
Thr	Cys	Ser	Thr	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln		
				165					170					175			
aag	cca	ggg	aag	gct	cca	aag	ctg	ctg	atc	tac	agc	aca	tcc	aac	ctg		576
Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser	Thr	Ser	Asn	Leu		
			180					185					190				
gct	tct	ggg	gtg	cca	agc	aga	ttc	agc	ggg	agc	ggg	agc	ggg	acc	gac		624
Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp		
		195					200						205				
ttc	acc	ttc	acc	atc	agc	agc	ctc	cag	cca	gag	gac	atc	gcc	acc	tac		672
Phe	Thr	Phe	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr		
	210						215				220						
tac	tgc	cat	cag	tgg	agt	agt	tat	ccc	acg	ttc	ggc	caa	ggg	acc	aag		720
Tyr	Cys	His	Gln	Trp	Ser	Ser	Tyr	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys		
	225				230					235					240		
gtg	gag	atc	aaa	gt													734
Val	Glu	Ile	Lys														

<210> 4  
 <211> 244  
 5 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> constructo sintético

10 <400> 4

Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val



ES 2 833 162 T3

<211> 705  
 <212> ADN  
 <213> artificial

5 <220>  
 <223> ácido nucleico sintético

<220>  
 <221> CDS

10 <222> (1)..(705)

<400> 5

gat ccc gcc gag ccc aaa tct cct gac aaa act cac aca tgc cca ccg	48
Asp Pro Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro	
1 5 10 15	
tgc cca gca cct cca gtc gcg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca	96
Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro	
20 25 30	
aaa ccc aag gac acc ctc atg atc gcc cgg acc cct gag gtc aca tgc	144
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys	
35 40 45	
gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg	192
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp	
50 55 60	
tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag	240
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu	
65 70 75 80	
gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg	288
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu	
85 90 95	
cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac	336
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn	
100 105 110	
aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg	384
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly	
115 120 125	
cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag	432
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu	
130 135 140	
ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat	480
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr	
145 150 155 160	
ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac	528
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn	
165 170 175	
aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc	576
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe	
180 185 190	
ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac	624

ES 2 833 162 T3

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 195 200 205

gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg 672  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 210 215 220

cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa aaa 705  
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys  
 225 230 235

<210> 6  
 <211> 235  
 <212> PRT  
 <213> artificial

5

<220>  
 <223> constructo sintético

10

<400> 6

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

Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 20 25 30

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 35 40 45

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 50 55 60

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 65 70 75 80

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 85 90 95

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 100 105 110

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 115 120 125

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 130 135 140

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 145 150 155 160

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

ES 2 833 162 T3

165

170

175

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
180 185 190

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
195 200 205

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
210 215 220

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys  
225 230 235

<210> 7  
<211> 204  
5 <212> ADN  
<213> artificial

<220>  
10 <223> ácido nucleico sintético

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(204)

15 <400> 7

ttt tgg gtg ctg gtg gtg gtt ggt gga gtc ctg gct tgc tat agc ttg 48  
Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu  
1 5 10 15

cta gta aca gtg gcc ttt att att ttc tgg gtg agg agt aag agg agc 96  
Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser  
20 25 30

agg ctc ctg cac agt gac tac atg aac atg act ccc cgc cgc ccc ggg 144  
Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly  
35 40 45

ccc acc cgc aag cat tac cag gcc tat gcc gcc gca cgc gac ttc gca 192  
Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Ala Tyr Ala Ala Ala Arg Asp Phe Ala  
50 55 60

gcc tat cgc tcc 204  
Ala Tyr Arg Ser  
65

<210> 8  
20 <211> 68  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
25 <223> constructo sintético

<400> 8

ES 2 833 162 T3

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

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

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

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

Ala Tyr Arg Ser  
65

<210> 9  
<211> 414  
5 <212> ADN  
<213> humano

<220>  
10 <221> CDS  
<222> (1)..(414)

<400> 9

gat ccc aaa ctc tgc tac ctg ctg gat gga atc ctc ttc atc tat ggt 48  
Asp Pro Lys Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly  
1 5 10 15

gtc att ctc act gcc ttg ttc ctg aga gtg aag ttc agc agg agc gca 96  
Val Ile Leu Thr Ala Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala  
20 25 30

gac gcc ccc gcg tac cag cag ggc cag aac cag ctc tat aac gag ctc 144  
Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu  
35 40 45

aat cta gga cga aga gag gag tac gat gtt ttg gac aag aga cgt ggc 192  
Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly  
50 55 60

cgg gac cct gag atg ggg gga aag ccg cag aga agg aag aac cct cag 240  
Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln  
65 70 75 80

gaa ggc ctg tac aat gaa ctg cag aaa gat aag atg gcg gag gcc tac 288  
Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr  
85 90 95

agt gag att ggg atg aaa ggc gag cgc cgg agg ggc aag ggg cac gat 336  
Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp  
100 105 110

ggc ctt tac cag ggt ctc agt aca gcc acc aag gac acc tac gac gcc 384  
Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala  
115 120 125

ctt cac atg cag gcc ctg ccc cct cgc taa  
 Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
 130 135

414

<210> 10  
 <211> 137  
 <212> PRT  
 <213> humano

5

<400> 10

Asp Pro Lys Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly  
 1 5 10 15

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

Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu  
 35 40 45

Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly  
 50 55 60

Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln  
 65 70 75 80

Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr  
 85 90 95

Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp  
 100 105 110

Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala  
 115 120 125

Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
 130 135

10

<210> 11  
 <211> 201  
 <212> ADN  
 <213> humano

15

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(201)

20

<400> 11

gat ccc aaa ctc tgc tat atc ctg gat gcc atc ctg ttt ctg tat gga  
 Asp Pro Lys Leu Cys Tyr Ile Leu Asp Ala Ile Leu Phe Leu Tyr Gly  
 1 5 10 15

48



ES 2 833 162 T3

atc agt gcc tca gtc ata atg tct aga atg gcc cag gtg caa ctg cag Ile Ser Ala Ser Val Ile Met Ser Arg Met Ala Gln Val Gln Leu Gln 20 25 30	96
cag tca ggg gct gag ctg gct aga cct ggg gct tca gtg aag atg tcc Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser 35 40 45	144
tgc aag gct tct ggc tac acc ttt act acc tac aca ata cac tgg gta Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Thr Ile His Trp Val 50 55 60	192
aga cgg agg cct gga cac gat ctg gaa tgg att gga tac att aat cct Arg Arg Arg Pro Gly His Asp Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro 65 70 75	240
agc agt gga tgt tct gac tac aat caa aac ttc aag ggc aag acc aca Ser Ser Gly Cys Ser Asp Tyr Asn Gln Asn Phe Lys Gly Lys Thr Thr 80 85 90 95	288
ttg act gca gac aag tcc tcc aac aca gcc tac atg caa ctg aac agc Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser 100 105 110	336
ctg aca tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga aga gcg gac Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Ala Asp 115 120 125	384
tat ggt aac tac gaa tat acc tgg ttt gct tac tgg ggc caa ggg acc Tyr Gly Asn Tyr Glu Tyr Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr 130 135 140	432
acg gtc acc gtc tcc tca agt gga ggc ggt tca ggt gga ggt ggc tct Thr Val Thr Val Ser Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser 145 150 155	480
ggc ggt ggc gga tcg gtc atc gag ctc act cag tct cca aaa ttc atg Gly Gly Gly Gly Ser Val Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met 160 165 170 175	528
tcc aca tca gta gga gac agg gtc aac gtc acc tac aag gcc agt cag Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Asn Val Thr Tyr Lys Ala Ser Gln 180 185 190	576
aat gtg ggt act aat gta gcc tgg ttt caa caa aaa cca ggg caa tct Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser 195 200 205	624
cct aaa gtt ctg att tac tcg gca tct tac cga tac agt gga gtc cct Pro Lys Val Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro 210 215 220	672
gat cgc ttc aca ggc agt gga tct gga aca gat ttc act ctc acc atc Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile 225 230 235	720
agc aat gtg cag tct gaa gac ttg gca gag tat ttc tgt cag caa tat Ser Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr 240 245 250 255	768
cac acc tat cct ctc acg ttc gga ggg ggc acc aag ctg gaa atc aaa His Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 260 265 270	816

ES 2 833 162 T3

cgg tca gat ccc gga ggc ggg ggt tct ggt gga ggc gga agc ggt ggc	864
Arg Ser Asp Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly	
275 280 285	
ggg ggt tca gga ggc ggg ggt tcc ggt ggt ggc ggc agt ggt ggt ggc	912
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly	
290 295 300	
ggc agt ggt ggt ggc ggc agt ggt ggt ggc ggc agt ggt gtc cac tcc	960
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Val His Ser	
305 310 315	
cag gtc caa ctg cag gag tca ggt cca ggt ctt gtg aga cct agc cag	1008
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln	
320 325 330 335	
acc ctg agc ctg acc tgc acc gtg tct ggc ttc acc atc agc agt ggt	1056
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Thr Ile Ser Ser Gly	
340 345 350	
tat agc tgg cac tgg gtg aga cag cca cct gga cga ggt ctt gag tgg	1104
Tyr Ser Trp His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp	
355 360 365	
att gga tac ata cag tac agt ggt atc act aac tac aac ccc tct ctc	1152
Ile Gly Tyr Ile Gln Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu	
370 375 380	
aaa agt aga gtg aca atg ctg gta gac acc agc aag aac cag ttc agc	1200
Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser	
385 390 395	
ctg aga ctc agc agc gtg aca gcc gcc gac acc gcg gtc tat tat tgt	1248
Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
400 405 410 415	
gca aga gaa gac tat gat tac cac tgg tac ttc gat gtc tgg ggc caa	1296
Ala Arg Glu Asp Tyr Asp Tyr His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln	
420 425 430	
ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca gga ggt ggt gga tcg ggc ggt ggc	1344
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly	
435 440 445	
ggg tcg ggt ggc ggc gga tct gac atc cag ctg acc cag agc cca agc	1392
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser	
450 455 460	
agc ctg agc gcc agc gtg ggt gac aga gtg acc atc acc tgt agt acc	1440
Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Thr	
465 470 475	
agc tcg agt gta agt tac atg cac tgg tac cag cag aag cca ggt aag	1488
Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys	
480 485 490 495	
gct cca aag ctg ctg atc tac agc aca tcc aac ctg gct tct ggt gtg	1536
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val	
500 505 510	
cca agc aga ttc agc ggt agc ggt agc ggt acc gac ttc acc ttc acc	1584
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr	

ES 2 833 162 T3

515				520				525								
atc	agc	agc	ctc	cag	cca	gag	gac	atc	gcc	acc	tac	tac	tgc	cat	cag	1632
Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	His	Gln	
		530					535					540				
tgg	agt	agt	tat	ccc	acg	ttc	ggc	caa	ggg	acc	aag	gtg	gag	atc	aaa	1680
Trp	Ser	Ser	Tyr	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	
	545					550					555					
gtg	gat	ccc	gcc	gag	ccc	aaa	tct	cct	gac	aaa	act	cac	aca	tgc	cca	1728
Val	Asp	Pro	Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Pro	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	
560					565				570						575	
ccg	tgc	cca	gca	cct	cca	gtc	gcg	gga	ccg	tca	gtc	ttc	ctc	ttc	ccc	1776
Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	
				580					585					590		
cca	aaa	ccc	aag	gac	acc	ctc	atg	atc	gcc	cgg	acc	cct	gag	gtc	aca	1824
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ala	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	
			595				600						605			
tgc	gtg	gtg	gtg	gac	gtg	agc	cac	gaa	gac	cct	gag	gtc	aag	ttc	aac	1872
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	
		610					615					620				
tgg	tac	gtg	gac	ggc	gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	aag	aca	aag	ccg	cgg	1920
Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	
	625					630					635					
gag	gag	cag	tac	aac	agc	acg	tac	cgt	gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc	gtc	1968
Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	
640					645					650					655	
ctg	cac	cag	gac	tgg	ctg	aat	ggc	aag	gag	tac	aag	tgc	aag	gtc	tcc	2016
Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	
				660					665					670		
aac	aaa	gcc	ctc	cca	gcc	ccc	atc	gag	aaa	acc	atc	tcc	aaa	gcc	aaa	2064
Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	
			675					680					685			
ggg	cag	ccc	cga	gaa	cca	cag	gtg	tac	acc	ctg	ccc	cca	tcc	cgg	gat	2112
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	
		690					695					700				
gag	ctg	acc	aag	aac	cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc	ctg	gtc	aaa	ggc	ttc	2160
Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	
	705					710					715					
tat	ccc	agc	gac	atc	gcc	gtg	gag	tgg	gag	agc	aat	ggg	cag	ccg	gag	2208
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	
720					725					730					735	
aac	aac	tac	aag	acc	acg	cct	ccc	gtg	ctg	gac	tcc	gac	ggc	tcc	ttc	2256
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	
				740					745					750		
ttc	ctc	tac	agc	aag	ctc	acc	gtg	gac	aag	agc	agg	tgg	cag	cag	ggg	2304
Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	
			755					760					765			
aac	gtc	ttc	tca	tgc	tcc	gtg	atg	cat	gag	gct	ctg	cac	aac	cac	tac	2352

ES 2 833 162 T3

Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr		
		770					775					780					
acg	cag	aag	agc	ctc	tcc	ctg	tct	ccg	ggt	aaa	aaa	gat	ccc	aaa	ttt		2400
Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Lys	Asp	Pro	Lys	Phe		
	785					790				795							
tgg	gtg	ctg	gtg	gtg	gtt	ggt	gga	gtc	ctg	gct	tgc	tat	agc	ttg	cta		2448
Trp	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu		
800					805					810					815		
gta	aca	gtg	gcc	ttt	att	att	ttc	tgg	gtg	agg	agt	aag	agg	agc	agg		2496
Val	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe	Trp	Val	Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Arg		
			820						825					830			
ctc	ctg	cac	agt	gac	tac	atg	aac	atg	act	ccc	cgc	cgc	ccc	ggg	ccc		2544
Leu	Leu	His	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn	Met	Thr	Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Pro		
			835				840						845				
acc	cgc	aag	cat	tac	cag	gcc	tat	gcc	gcc	gca	cgc	gac	ttc	gca	gcc		2592
Thr	Arg	Lys	His	Tyr	Gln	Ala	Tyr	Ala	Ala	Ala	Arg	Asp	Phe	Ala	Ala		
		850					855					860					
tat	cgc	tcc	ctg	aga	gtg	aag	ttc	agc	agg	agc	gca	gac	gcc	ccc	gcg		2640
Tyr	Arg	Ser	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala		
	865					870					875						
tac	cag	cag	ggc	cag	aac	cag	ctc	tat	aac	gag	ctc	aat	cta	gga	cga		2688
Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg		
880					885					890					895		
aga	gag	gag	tac	gat	gtt	ttg	gac	aag	aga	cgt	ggc	cgg	gac	cct	gag		2736
Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu		
				900					905					910			
atg	ggg	gga	aag	ccg	aga	agg	aag	aac	cct	cag	gaa	ggc	ctg	tac	aat		2784
Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn		
			915					920					925				
gaa	ctg	cag	aaa	gat	aag	atg	gcg	gag	gcc	tac	agt	gag	att	ggg	atg		2832
Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met		
		930					935					940					
aaa	ggc	gag	cgc	cgg	agg	ggc	aag	ggg	cac	gat	ggc	ctt	tac	cag	ggt		2880
Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly		
	945					950					955						
ctc	agt	aca	gcc	acc	aag	gac	acc	tac	gac	gcc	ctt	cac	atg	cag	gcc		2928
Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala		
960					965					970					975		
ctg	ccc	cct	cgc	taa													2943
Leu	Pro	Pro	Arg														

<210> 14  
 <211> 978  
 5 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <223> constructo sintético

10

ES 2 833 162 T3

<400> 14

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

Ala Ser Val Ile Met Ser Arg Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser  
20 25 30

Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys  
35 40 45

Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Thr Ile His Trp Val Arg Arg  
50 55 60

Arg Pro Gly His Asp Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser  
65 70 75 80

Gly Cys Ser Asp Tyr Asn Gln Asn Phe Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr  
85 90 95

Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr  
100 105 110

Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Ala Asp Tyr Gly  
115 120 125

Asn Tyr Glu Tyr Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
130 135 140

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

Gly Gly Ser Val Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr  
165 170 175

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

Gly Thr Asn Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys  
195 200 205

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

Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn  
225 230 235 240

ES 2 833 162 T3

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

ES 2 833 162 T3

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser  
500 505 510

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser  
515 520 525

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser  
530 535 540

Ser Tyr Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Val Asp  
545 550 555 560

Pro Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
565 570 575

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
580 585 590

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
595 600 605

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
610 615 620

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
625 630 635 640

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
645 650 655

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
660 665 670

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
675 680 685

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu  
690 695 700

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
705 710 715 720

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
725 730 735

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
740 745 750

ES 2 833 162 T3

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

Pro Arg

<210> 15  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <223> péptido sintético

5 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (8)..(20)  
 <223> SVFLFPPKPKDTL

10 <400> 15  
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5 10 15  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Met Ile Ser Arg Thr  
 20 25

15 <210> 16  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> artificial

20 <220>  
 <223> péptido sintético

25 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (7)..(19)  
 <223> SVFLFPPKPKDTL

<400> 16  
 Pro Pro Val Ala Gly Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5 10 15  
 Xaa Xaa Xaa Met Ile Ala Arg Thr  
 20

30 <210> 17  
 <211> 2901  
 <212> ADN  
 <213> artificial

35 <220>  
 <223> molécula sintética

40 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(2901)

<400> 17  
 atg gat ttt cag gtg cag att ttc agc ttc ctg cta atc agt gcc tca  
 45 Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser

ES 2 833 162 T3

1	5	10	15	
gtc ata atg tct aga cag gtg aag ctg cag cag tct ggg act gtg ctg				96
Val Ile Met Ser Arg Gln Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu	20	25	30	
gca agg cct ggg gct tcc gtg aag atg tcc tgc aag gct tct ggc tac				144
Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr	35	40	45	
agg ttt acc aac tac tgg atg cac tgg gta aaa cag agg cct gga cag				192
Arg Phe Thr Asn Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln	50	55	60	
ggc cta gaa tgg att ggt gtt att tat cct gga aat agt gat act agc				240
Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Ser	65	70	75	80
tac aac cag aag ttc aag ggc aag gcc aaa ctg act gca gtc aca tcc				288
Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser	85	90	95	
gcc agc act gcc tac atg gag ctc agc agc ctg aca aat gag gac tct				336
Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser	100	105	110	
gcg gtc tat tac tgt aca aga gag gga gaa ggc tct gac tac tgg ggc				384
Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Glu Gly Glu Gly Ser Asp Tyr Trp Gly	115	120	125	
caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca ggt gga ggc ggt tca ggc gga				432
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly	130	135	140	
ggc ggc tct ggc ggt ggc gga tgc caa att gtt ctc acc cag tct cca				480
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro	145	150	155	160
gca acc atg gct gca tct ccc ggg gag aag atc act atc acc tgc agt				528
Ala Thr Met Ala Ala Ser Pro Gly Glu Lys Ile Thr Ile Thr Cys Ser	165	170	175	
gcc agc tca agt ata agt tcc aat tac ttg cat tgg tat cag cag aag				576
Ala Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys	180	185	190	
cca gga ttc tcc cct aaa ctc ttg att tat agg act tcc aat ctg gct				624
Pro Gly Phe Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Ala	195	200	205	
tct gga gtc cca gct cgc ttc agt ggc agt ggg tct ggg acc tct tac				672
Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr	210	215	220	
tct ctc aca att ggc acc atg gag gct gaa gat gtt gcc act tac tac				720
Ser Leu Thr Ile Gly Thr Met Glu Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr	225	230	235	240
tgc cag cag ggt agt agt ata ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag				768
Cys Gln Gln Gly Ser Ser Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys	245	250	255	
ctg gag ctg gcg gcc gca gga ggc ggg ggt tct ggt gga ggc gga agc				816

ES 2 833 162 T3

Leu	Glu	Leu	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser		
			260					265					270				
ggt	ggc	ggg	ggt	tca	gga	ggc	ggg	ggt	tcc	ggt	ggt	ggc	ggc	agt	ggt		864
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly		
		275					280					285					
ggt	ggc	ggc	agt	ggt	ggt	ggc	ggc	agt	ggt	ggt	ggc	ggc	agt	ggt	gtc		912
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Val		
	290					295					300						
cac	tcc	cag	gtc	caa	ctg	cag	gag	tca	ggt	cca	ggt	ctt	gtg	aga	cct		960
His	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Arg	Pro		
305				310				315							320		
agc	cag	acc	ctg	agc	ctg	acc	tgc	acc	gtg	tct	ggc	ttc	acc	atc	agc		1008
Ser	Gln	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Thr	Ile	Ser		
				325				330						335			
agt	ggt	tat	agc	tgg	cac	tgg	gtg	aga	cag	cca	cct	gga	cga	ggt	ctt		1056
Ser	Gly	Tyr	Ser	Trp	His	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Arg	Gly	Leu		
			340					345					350				
gag	tgg	att	gga	tac	ata	cag	tac	agt	ggt	atc	act	aac	tac	aac	ccc		1104
Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Gln	Tyr	Ser	Gly	Ile	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro		
		355				360						365					
tct	ctc	aaa	agt	aga	gtg	aca	atg	ctg	gta	gac	acc	agc	aag	aac	cag		1152
Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Met	Leu	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln		
	370					375					380						
ttc	agc	ctg	aga	ctc	agc	agc	gtg	aca	gcc	gcc	gac	acc	gcg	gtc	tat		1200
Phe	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr		
385					390					395					400		
tat	tgt	gca	aga	gaa	gac	tat	gat	tac	cac	tgg	tac	ttc	gat	gtc	tgg		1248
Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	Asp	Tyr	Asp	Tyr	His	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp		
				405					410					415			
ggc	caa	ggg	acc	acg	gtc	acc	gtc	tcc	tca	gga	ggt	ggt	gga	tcg	ggc		1296
Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly		
			420					425					430				
ggt	ggc	ggg	tcg	ggt	ggc	ggc	gga	tct	gac	atc	cag	ctg	acc	cag	agc		1344
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser		
		435					440					445					
cca	agc	agc	ctg	agc	gcc	agc	gtg	ggt	gac	aga	gtg	acc	atc	acc	tgt		1392
Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys		
	450					455					460						
agt	acc	agc	tcg	agt	gta	agt	tac	atg	cac	tgg	tac	cag	cag	aag	cca		1440
Ser	Thr	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro		
465					470					475					480		
ggt	aag	gct	cca	aag	ctg	ctg	atc	tac	agc	aca	tcc	aac	ctg	gct	tct		1488
Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser		
				485				490						495			
ggt	gtg	cca	agc	aga	ttc	agc	ggt	agc	ggt	agc	ggt	acc	gac	ttc	acc		1536
Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr		
			500					505					510				

ES 2 833 162 T3

ttc acc atc agc agc ctc cag cca gag gac atc gcc acc tac tac tgc	1584
Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys	
515 520 525	
cat cag tgg agt agt tat ccc acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gag	1632
His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu	
530 535 540	
atc aaa gtg gat ccc gcc gag ccc aaa tct cct gac aaa act cac aca	1680
Ile Lys Val Asp Pro Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr	
545 550 555 560	
tgc cca ccg tgc cca gca cct cca gtc gcg gga ccg tca gtc ttc ctc	1728
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu	
565 570 575	
ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc gcc cgg acc cct gag	1776
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala Arg Thr Pro Glu	
580 585 590	
gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag	1824
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys	
595 600 605	
ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag	1872
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys	
610 615 620	
ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc	1920
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu	
625 630 635 640	
acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag	1968
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys	
645 650 655	
gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa	2016
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys	
660 665 670	
gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc	2064
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser	
675 680 685	
cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa	2112
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys	
690 695 700	
ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag	2160
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln	
705 710 715 720	
ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc	2208
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly	
725 730 735	
tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag	2256
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln	
740 745 750	
cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac	2304
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn	
755 760 765	

ES 2 833 162 T3

cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa aaa gat ccc 2352  
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp Pro  
 770 775 780

aaa ttt tgg gtg ctg gtg gtg gtt ggt gga gtc ctg gct tgc tat agc 2400  
 Lys Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser  
 785 790 795 800

ttg cta gta aca gtg gcc ttt att att ttc tgg gtg agg agt aag agg 2448  
 Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg  
 805 810 815

agc agg ctc ctg cac agt gac tac atg aac atg act ccc cgc cgc ccc 2496  
 Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro  
 820 825 830

ggg ccc acc cgc aag cat tac cag gcc tat gcc gcc gca cgc gac ttc 2544  
 Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Ala Tyr Ala Ala Ala Arg Asp Phe  
 835 840 845

gca gcc tat cgc tcc ctg aga gtg aag ttc agc agg agc gca gac gcc 2592  
 Ala Ala Tyr Arg Ser Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala  
 850 855 860

ccc gcg tac cag cag ggc cag aac cag ctc tat aac gag ctc aat cta 2640  
 Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu  
 865 870 875 880

gga cga aga gag gag tac gat gtt ttg gac aag aga cgt ggc cgg gac 2688  
 Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp  
 885 890 895

cct gag atg ggg gga aag ccg aga agg aag aac cct cag gaa ggc ctg 2736  
 Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu  
 900 905 910

tac aat gaa ctg cag aaa gat aag atg gcg gag gcc tac agt gag att 2784  
 Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile  
 915 920 925

ggg atg aaa ggc gag cgc cgg agg ggc aag ggg cac gat ggc ctt tac 2832  
 Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr  
 930 935 940

cag ggt ctc agt aca gcc acc aag gac acc tac gac gcc ctt cac atg 2880  
 Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met  
 945 950 955 960

cag gcc ctg ccc cct cgc taa 2901  
 Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
 965

<210> 18  
 <211> 966  
 5 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <223> constructo sintético

10 <400> 18

ES 2 833 162 T3

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser  
 1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gln Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu  
 20 25 30

Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr  
 35 40 45

Arg Phe Thr Asn Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln  
 50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Ser  
 65 70 75 80

Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser  
 85 90 95

Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser  
 100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Glu Gly Glu Gly Ser Asp Tyr Trp Gly  
 115 120 125

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

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro  
 145 150 155 160

Ala Thr Met Ala Ala Ser Pro Gly Glu Lys Ile Thr Ile Thr Cys Ser  
 165 170 175

Ala Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys  
 180 185 190

Pro Gly Phe Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Ala  
 195 200 205

Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr  
 210 215 220

Ser Leu Thr Ile Gly Thr Met Glu Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr  
 225 230 235 240

Cys Gln Gln Gly Ser Ser Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys  
 245 250 255

ES 2 833 162 T3

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

ES 2 833 162 T3

	500		505		510														
Phe	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys				
	515						520					525							
His	Gln	Trp	Ser	Ser	Tyr	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu				
	530					535					540								
Ile	Lys	Val	Asp	Pro	Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Pro	Asp	Lys	Thr	His	Thr				
545					550					555					560				
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu				
				565					570					575					
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ala	Arg	Thr	Pro	Glu				
			580					585					590						
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys				
		595					600					605							
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys				
	610					615					620								
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu				
625					630					635					640				
Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys				
				645					650					655					
Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys				
			660					665					670						
Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser				
		675					680					685							
Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys				
	690					695					700								
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln				
705					710					715					720				
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly				
				725					730					735					
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln				
			740					745					750						

ES 2 833 162 T3

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn  
 755 760 765

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp Pro  
 770 775 780

Lys Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser  
 785 790 795 800

Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg  
 805 810 815

Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro  
 820 825 830

Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Ala Tyr Ala Ala Ala Arg Asp Phe  
 835 840 845

Ala Ala Tyr Arg Ser Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala  
 850 855 860

Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu  
 865 870 875 880

Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp  
 885 890 895

Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu  
 900 905 910

Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile  
 915 920 925

Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr  
 930 935 940

Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met  
 945 950 955 960

Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
 965

<210> 19  
 <211> 2937  
 <212> ADN  
 <213> artificial

<220>  
 <223> molécula sintética

5

10

ES 2 833 162 T3

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(2937)

5 <400> 19

atg gat ttt cag gtg cag att ttc agc ttc ctg cta atc agt gcc tca	48
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser	
1 5 10 15	
gtc ata atg tct aga atg gcc cag gtg caa ctg cag cag tca ggg gct	96
Val Ile Met Ser Arg Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala	
20 25 30	
gag ctg gct aga cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct	144
Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser	
35 40 45	
ggc tac acc ttt act acc tac aca ata cac tgg gta aga cgg agg cct	192
Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Thr Ile His Trp Val Arg Arg Arg Pro	
50 55 60	
gga cac gat ctg gaa tgg att gga tac att aat cct agc agt gga tgt	240
Gly His Asp Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Cys	
65 70 75 80	
tct gac tac aat caa aac ttc aag ggc aag acc aca ttg act gca gac	288
Ser Asp Tyr Asn Gln Asn Phe Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp	
85 90 95	
aag tcc tcc aac aca gcc tac atg caa ctg aac agc ctg aca tct gag	336
Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu	
100 105 110	
gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga aga gcg gac tat ggt aac tac	384
Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr	
115 120 125	
gaa tat acc tgg ttt gct tac tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc	432
Glu Tyr Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val	
130 135 140	
tcc tca agt gga ggc ggt tca ggt gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga	480
Ser Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly	
145 150 155 160	
tcg gtc atc gag ctc act cag tct cca aaa ttc atg tcc aca tca gta	528
Ser Val Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val	
165 170 175	
gga gac agg gtc aac gtc acc tac aag gcc agt cag aat gtg ggt act	576
Gly Asp Arg Val Asn Val Thr Tyr Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr	
180 185 190	
aat gta gcc tgg ttt caa caa aaa cca ggg caa tct cct aaa gtt ctg	624
Asn Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Val Leu	
195 200 205	
att tac tcg gca tct tac cga tac agt gga gtc cct gat cgc ttc aca	672
Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr	
210 215 220	

ES 2 833 162 T3

ggc agt gga tct gga aca gat ttc act ctc acc atc agc aat gtg cag	720
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln	
225 230 235 240	
tct gaa gac ttg gca gag tat ttc tgt cag caa tat cac acc tat cct	768
Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr His Thr Tyr Pro	
245 250 255	
ctc acg ttc gga ggg ggc acc aag ctg gaa atc aaa cgg gcg gcc gct	816
Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala	
260 265 270	
ggt ggc ggg gga tct gga gga ggt ggt tcc gga gga ggt ggt tca gga	864
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly	
275 280 285	
ggt ggc ggc tcc gga gga ggt gga tca gga ggc ggt ggc agc ggc ggc	912
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly	
290 295 300	
gga gga tct ggt ggc ggt ggc tcc gtc gac atg gcg cag gtc cag ctc	960
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Val Asp Met Ala Gln Val Gln Leu	
305 310 315 320	
cag gag tcc ggc gga ggc ctg gtg cag cca ggc ggg tcc ctg aag ctg	1008
Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu	
325 330 335	
agc tgt gct gca tcc ggt ttt acc ttt tcc agt tac gga atg tcc tgg	1056
Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp	
340 345 350	
gtt cgc cag acc ccc gat aag cgg ctg gaa ctg gtg gcg aca atc aac	1104
Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val Ala Thr Ile Asn	
355 360 365	
tcc aat ggc gga tct act tat tac cca gat tct gtt aaa ggc cgt ttt	1152
Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe	
370 375 380	
acc atc tcc agg gat aac gcc aaa aac acc ctg tat ctg cag atg tct	1200
Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser	
385 390 395 400	
tct ttg aag agt gag gac act gct atg tac tat tgc gcc cgg gat cgt	1248
Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg	
405 410 415	
gac ggc tac gat gaa ggt ttc gac tac tgg gga cag ggc aca acc gtc	1296
Asp Gly Tyr Asp Glu Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val	
420 425 430	
act gtc tct tcc ggc ggt ggt ggc agc ggc ggc ggg gga agc ggc ggg	1344
Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly	
435 440 445	
ggt ggt tcc gac atc gag ctc acc caa tcc ccc tcc atc atg tcc gcc	1392
Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Met Ser Ala	
450 455 460	
tcc cca ggc gag aag gtc acc atg acc tgc tct gct tct tcc tcc gtg	1440
Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val	
465 470 475 480	

ES 2 833 162 T3

tct tac atg cat tgg tac cag cag aaa tct ggt acc tct ccg aaa cgc	1488
Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg	
485 490 495	
tgg atc tat gac acc tct aag ttg gct tcc ggg gtg cca gcc cgg ttc	1536
Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe	
500 505 510	
tct ggc agc gga agt gga acc tcc tac tcc ctc act att tct tct atg	1584
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met	
515 520 525	
gag gct gaa gac gcc gcg acc tat tat tgt cag caa tgg agc agc aac	1632
Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn	
530 535 540	
ccc cct act ctg ggg cgc cgt act cag ctg cag ctg aaa cgc gcg gat	1680
Pro Pro Thr Leu Gly Arg Arg Thr Gln Leu Gln Leu Lys Arg Ala Asp	
545 550 555 560	
ccc gcc gag ccc aaa tct cct gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc	1728
Pro Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys	
565 570 575	
cca gca cct cca gtc gcg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa	1776
Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys	
580 585 590	
ccc aag gac acc ctc atg atc gcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg	1824
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val	
595 600 605	
gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac	1872
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr	
610 615 620	
gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag	1920
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu	
625 630 635 640	
cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac	1968
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His	
645 650 655	
cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa	2016
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys	
660 665 670	
gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag	2064
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln	
675 680 685	
ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc ccg gat gag ctg	2112
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu	
690 695 700	
acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc	2160
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro	
705 710 715 720	
agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac	2208
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn	

ES 2 833 162 T3

				725				730				735				
tac	aag	acc	acg	cct	ccc	gtg	ctg	gac	tcc	gac	ggc	tcc	ttc	ttc	ctc	2256
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	
			740					745					750			
tac	agc	aag	ctc	acc	gtg	gac	aag	agc	agg	tgg	cag	cag	ggg	aac	gtc	2304
Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	
		755					760					765				
ttc	tca	tgc	tcc	gtg	atg	cat	gag	gct	ctg	cac	aac	cac	tac	acg	cag	2352
Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	
		770				775					780					
aag	agc	ctc	tcc	ctg	tct	ccg	ggt	aaa	aaa	gat	ccc	aaa	ttt	tgg	gtg	2400
Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Lys	Asp	Pro	Lys	Phe	Trp	Val	
785					790					795					800	
ctg	gtg	gtg	gtt	ggt	gga	gtc	ctg	gct	tgc	tat	agc	ttg	cta	gta	aca	2448
Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	Thr	
				805					810					815		
gtg	gcc	ttt	att	att	ttc	tgg	gtg	agg	agt	aag	agg	agc	agg	ctc	ctg	2496
Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe	Trp	Val	Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	Leu	Leu	
			820					825					830			
cac	agt	gac	tac	atg	aac	atg	act	ccc	cgc	cgc	ccc	ggg	ccc	acc	cgc	2544
His	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn	Met	Thr	Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Pro	Thr	Arg	
		835					840					845				
aag	cat	tac	cag	gcc	tat	gcc	gcc	gca	cgc	gac	ttc	gca	gcc	tat	cgc	2592
Lys	His	Tyr	Gln	Ala	Tyr	Ala	Ala	Ala	Arg	Asp	Phe	Ala	Ala	Tyr	Arg	
	850					855					860					
tcc	ctg	aga	gtg	aag	ttc	agc	agg	agc	gca	gac	gcc	ccc	gcg	tac	cag	2640
Ser	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	
865					870					875					880	
cag	ggc	cag	aac	cag	ctc	tat	aac	gag	ctc	aat	cta	gga	cga	aga	gag	2688
Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	
			885					890						895		
gag	tac	gat	gtt	ttg	gac	aag	aga	cgt	ggc	cgg	gac	cct	gag	atg	ggg	2736
Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	
			900					905					910			
gga	aag	ccg	aga	agg	aag	aac	cct	cag	gaa	ggc	ctg	tac	aat	gaa	ctg	2784
Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	
		915					920						925			
cag	aaa	gat	aag	atg	gcg	gag	gcc	tac	agt	gag	att	ggg	atg	aaa	ggc	2832
Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	
	930					935					940					
gag	cgc	cgg	agg	ggc	aag	ggg	cac	gat	ggc	ctt	tac	cag	ggt	ctc	agt	2880
Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	
945					950					955					960	
aca	gcc	acc	aag	gac	acc	tac	gac	gcc	ctt	cac	atg	cag	gcc	ctg	ccc	2928
Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	
				965					970					975		
cct	cgc	taa														2937
Pro	Arg															

ES 2 833 162 T3

<210> 20  
 <211> 978  
 <212> PRT  
 <213> artificial

5

<220>  
 <223> constructo sintético

<400> 20

10

```

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1           5           10           15

Val Ile Met Ser Arg Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala
          20           25           30

Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser
          35           40           45

Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Thr Ile His Trp Val Arg Arg Arg Pro
50           55           60

Gly His Asp Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Cys
65           70           75           80

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

Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu
          100          105          110

Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr
          115          120          125

Glu Tyr Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
130           135           140

Ser Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
145           150           155           160

Ser Val Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val
          165          170          175

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

Asn Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Val Leu
    
```

ES 2 833 162 T3

195	200	205																	
Ile	Tyr	Ser	Ala	Ser	Tyr	Arg	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr				
210						215					220								
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Asn	Val	Gln				
225					230					235					240				
Ser	Glu	Asp	Leu	Ala	Glu	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Tyr	His	Thr	Tyr	Pro				
				245					250					255					
Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala	Ala	Ala				
			260					265					270						
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly				
		275					280					285							
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly				
	290					295					300								
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Val	Asp	Met	Ala	Gln	Val	Gln	Leu				
305					310					315					320				
Gln	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Lys	Leu				
				325					330					335					
Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Gly	Met	Ser	Trp				
		340						345					350						
Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Asp	Lys	Arg	Leu	Glu	Leu	Val	Ala	Thr	Ile	Asn				
		355					360					365							
Ser	Asn	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe				
	370					375					380								
Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Ser				
385					390					395				400					
Ser	Leu	Lys	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Arg				
				405					410					415					
Asp	Gly	Tyr	Asp	Glu	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val				
			420					425					430						
Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly				
		435					440					445							

ES 2 833 162 T3

Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Met Ser Ala  
 450 455 460

Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val  
 465 470 475 480

Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg  
 485 490 495

Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe  
 500 505 510

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met  
 515 520 525

Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn  
 530 535 540

Pro Pro Thr Leu Gly Arg Arg Thr Gln Leu Gln Leu Lys Arg Ala Asp  
 545 550 555 560

Pro Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 565 570 575

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
 580 585 590

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
 595 600 605

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
 610 615 620

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
 625 630 635 640

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
 645 650 655

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
 660 665 670

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
 675 680 685

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu  
 690 695 700

ES 2 833 162 T3

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
 705 710 715 720  
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 725 730 735  
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
 740 745 750  
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
 755 760 765  
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
 770 775 780  
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp Pro Lys Phe Trp Val  
 785 790 795 800  
 Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr  
 805 810 815  
 Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu  
 820 825 830  
 His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg  
 835 840 845  
 Lys His Tyr Gln Ala Tyr Ala Ala Ala Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg  
 850 855 860  
 Ser Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln  
 865 870 875 880  
 Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu  
 885 890 895  
 Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly  
 900 905 910  
 Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu  
 915 920 925  
 Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly  
 930 935 940  
 Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser  
 945 950 955 960

ES 2 833 162 T3

Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro  
 965 970 975

Pro Arg

<210> 21  
 <211> 3006  
 5 <212> ADN  
 <213> artificial

<220>  
 <223> molécula sintética

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(2985)

15 <400> 21

atg gat ttt cag gtg cag att ttc agc ttc ctg cta atc agt gcc tca	48
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser	
1 5 10 15	
gtc ata atg tct aga atg gcc cag gtg caa ctg cag cag tca ggg gct	96
Val Ile Met Ser Arg Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala	
20 25 30	
gag ctg gct aga cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct	144
Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser	
35 40 45	
ggc tac acc ttt act acc tac aca ata cac tgg gta aga cgg agg cct	192
Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Thr Ile His Trp Val Arg Arg Arg Pro	
50 55 60	
gga cac gat ctg gaa tgg att gga tac att aat cct agc agt gga tgt	240
Gly His Asp Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Cys	
65 70 75 80	
tct gac tac aat caa aac ttc aag ggc aag acc aca ttg act gca gac	288
Ser Asp Tyr Asn Gln Asn Phe Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp	
85 90 95	
aag tcc tcc aac aca gcc tac atg caa ctg aac agc ctg aca tct gag	336
Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu	
100 105 110	
gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga aga gcg gac tat ggt aac tac	384
Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr	
115 120 125	
gaa tat acc tgg ttt gct tac tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc	432
Glu Tyr Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val	
130 135 140	
tcc tca agt gga ggc ggt tca ggt gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga	480
Ser Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly	
145 150 155 160	

ES 2 833 162 T3

tcg gtc atc gag ctc act cag tct cca aaa ttc atg tcc aca tca gta	528
Ser Val Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val	
165 170 175	
gga gac agg gtc aac gtc acc tac aag gcc agt cag aat gtg ggt act	576
Gly Asp Arg Val Asn Val Thr Tyr Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr	
180 185 190	
aat gta gcc tgg ttt caa caa aaa cca ggg caa tct cct aaa gtt ctg	624
Asn Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Val Leu	
195 200 205	
att tac tcg gca tct tac cga tac agt gga gtc cct gat cgc ttc aca	672
Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr	
210 215 220	
ggc agt gga tct gga aca gat ttc act ctc acc atc agc aat gtg cag	720
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln	
225 230 235 240	
tct gaa gac ttg gca gag tat ttc tgt cag caa tat cac acc tat cct	768
Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr His Thr Tyr Pro	
245 250 255	
ctc acg ttc gga ggg ggc acc aag ctg gaa atc aaa cgg gcg gcc gca	816
Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala	
260 265 270	
gga ggc ggg ggt tct ggt gga ggc gga agc ggt ggc ggg ggt tca gga	864
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly	
275 280 285	
ggc ggg ggt tcc ggt ggt ggc ggc agt ggt ggt ggc ggc agt ggt ggt	912
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly	
290 295 300	
ggc ggc agt ggt ggt ggc ggc agt gtc gac ggt gtc cac tcc cag gtg	960
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Val Asp Gly Val His Ser Gln Val	
305 310 315 320	
cag att ttc agc ttc ctg cta atc agt gcc tca gtc ata atg tct aga	1008
Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser Val Ile Met Ser Arg	
325 330 335	
atg gcc cag gtg aag ctg cag cag tct ggc gct gag ttg gtg aaa cct	1056
Met Ala Gln Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro	
340 345 350	
ggg gct tca gtg aag ata tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttc act	1104
Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr	
355 360 365	
gac cat gct att cac tgg gcg aag cag aag cct gaa cag ggc ctg gaa	1152
Asp His Ala Ile His Trp Ala Lys Gln Lys Pro Glu Gln Gly Leu Glu	
370 375 380	
tgg att gga tat att tct ccc gga aat gat gat att aag tac aat gag	1200
Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr Asn Glu	
385 390 395 400	
aag ttc aag ggc aag gcc aca ctg act gca gac aaa tcc tcc agc act	1248
Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr	

ES 2 833 162 T3

				405					410					415						
gcc	tac	atg	cag	ctc	aac	agc	ctg	aca	tct	gag	gat	tct	gca	gtg	tat					1296
Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Asn	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr					
			420					425					430							
ttc	tgt	aaa	aga	tcg	tac	tac	ggc	cac	tgg	ggc	caa	ggc	acc	acg	gtc					1344
Phe	Cys	Lys	Arg	Ser	Tyr	Tyr	Gly	His	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val					
		435					440					445								
acc	gtc	tcc	tca	ggt	gga	ggc	ggt	tca	ggc	gga	ggt	ggc	tct	ggc	ggt					1392
Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly					
	450					455						460								
ggc	gga	tcg	gac	atc	gag	ctc	act	cag	tct	cca	gcc	tcc	tta	tct	gta					1440
Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Glu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ser	Val					
465					470					475					480					
tct	gtg	gga	gaa	act	gtc	acc	atc	aca	tgt	cga	gca	agt	gag	aat	att					1488
Ser	Val	Gly	Glu	Thr	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Asn	Ile					
				485					490					495						
tac	agt	aat	tta	gca	tgg	tac	caa	cag	aaa	cag	gga	aaa	tct	cct	cag					1536
Tyr	Ser	Asn	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Gln	Gly	Lys	Ser	Pro	Gln					
			500					505					510							
ctc	ctg	gtc	tat	gct	gca	aca	aac	tta	gca	gat	ggt	gtg	cca	tca	agg					1584
Leu	Leu	Val	Tyr	Ala	Ala	Thr	Asn	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg					
		515					520					525								
ttc	agt	ggc	agt	gga	tcg	ggc	aca	cag	tat	tcc	ctc	aag	atc	aac	agc					1632
Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Gln	Tyr	Ser	Leu	Lys	Ile	Asn	Ser					
	530					535					540									
ctg	cag	tct	gaa	gat	ttt	ggg	agt	tat	tac	tgt	caa	cat	ttt	tgg	ggt					1680
Leu	Gln	Ser	Glu	Asp	Phe	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Phe	Trp	Gly					
545					550					555					560					
act	ccg	tac	acg	ttc	gga	ggg	ggg	acc	aag	ctg	gag	ctg	aaa	gtg	gat					1728
Thr	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Val	Asp					
				565					570					575						
ccc	gcc	gag	ccc	aaa	tct	cct	gac	aaa	act	cac	aca	tgc	cca	ccg	tgc					1776
Pro	Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Pro	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys					
			580					585					590							
cca	gca	cct	cca	gtc	gcg	gga	ccg	tca	gtc	ttc	ctc	ttc	ccc	cca	aaa					1824
Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys					
		595					600					605								
ccc	aag	gac	acc	ctc	atg	atc	gcc	cgg	acc	cct	gag	gtc	aca	tgc	gtg					1872
Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ala	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val					
	610					615					620									
gtg	gtg	gac	gtg	agc	cac	gaa	gac	cct	gag	gtc	aag	ttc	aac	tgg	tac					1920
Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr					
625					630					635					640					
gtg	gac	ggc	gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	aag	aca	aag	ccg	cgg	gag	gag					1968
Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu					
				645					650					655						
cag	tac	aac	agc	acg	tac	cgt	gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc	gtc	ctg	cac					2016

ES 2 833 162 T3

Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	
			660					665					670			
cag	gac	tgg	ctg	aat	ggc	aag	gag	tac	aag	tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	2064
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	
		675					680					685				
gcc	ctc	cca	gcc	ccc	atc	gag	aaa	acc	atc	tcc	aaa	gcc	aaa	ggg	cag	2112
Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	
	690					695					700					
ccc	cga	gaa	cca	cag	gtg	tac	acc	ctg	ccc	cca	tcc	cgg	gat	gag	ctg	2160
Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	
705					710					715					720	
acc	aag	aac	cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc	ctg	gtc	aaa	ggc	ttc	tat	ccc	2208
Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	
				725					730					735		
agc	gac	atc	gcc	gtg	gag	tgg	gag	agc	aat	ggg	cag	ccg	gag	aac	aac	2256
Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	
			740						745					750		
tac	aag	acc	acg	cct	ccc	gtg	ctg	gac	tcc	gac	ggc	tcc	ttc	ttc	ctc	2304
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	
			755				760					765				
tac	agc	aag	ctc	acc	gtg	gac	aag	agc	agg	tgg	cag	cag	ggg	aac	gtc	2352
Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	
	770					775					780					
ttc	tca	tgc	tcc	gtg	atg	cat	gag	gct	ctg	cac	aac	cac	tac	acg	cag	2400
Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	
785					790					795					800	
aag	agc	ctc	tcc	ctg	tct	ccg	ggt	aaa	aaa	gat	ccc	aaa	ttt	tgg	gtg	2448
Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Lys	Asp	Pro	Lys	Phe	Trp	Val	
				805					810					815		
ctg	gtg	gtg	gtt	ggt	gga	gtc	ctg	gct	tgc	tat	agc	ttg	cta	gta	aca	2496
Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	Thr	
			820					825					830			
gtg	gcc	ttt	att	att	ttc	tgg	gtg	agg	agt	aag	agg	agc	agg	ctc	ctg	2544
Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe	Trp	Val	Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	Leu	Leu	
		835					840					845				
cac	agt	gac	tac	atg	aac	atg	act	ccc	cgc	cgc	ccc	ggg	ccc	acc	cgc	2592
His	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn	Met	Thr	Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Pro	Thr	Arg	
	850					855					860					
aag	cat	tac	cag	gcc	tat	gcc	gcc	gca	cgc	gac	ttc	gca	gcc	tat	cgc	2640
Lys	His	Tyr	Gln	Ala	Tyr	Ala	Ala	Ala	Arg	Asp	Phe	Ala	Ala	Tyr	Arg	
	865				870					875					880	
tcc	ctg	aga	gtg	aag	ttc	agc	agg	agc	gca	gac	gcc	ccc	gcg	tac	cag	2688
Ser	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	
				885					890					895		
cag	ggc	cag	aac	cag	ctc	tat	aac	gag	ctc	aat	cta	gga	cga	aga	gag	2736
Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	
			900					905					910			

ES 2 833 162 T3

gag tac gat gtt ttg gac aag aga cgt ggc cgg gac cct gag atg ggg 2784  
 Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly  
 915 920 925

gga aag ccg aga agg aag aac cct cag gaa ggc ctg tac aat gaa ctg 2832  
 Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu  
 930 935 940

cag aaa gat aag atg gcg gag gcc tac agt gag att ggg atg aaa ggc 2880  
 Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly  
 945 950 955 960

gag cgc cgg agg ggc aag ggg cac gat ggc ctt tac cag ggt ctc agt 2928  
 Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser  
 965 970 975

aca gcc acc aag gac acc tac gac gcc ctt cac atg cag gcc ctg ccc 2976  
 Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro  
 980 985 990

cct cgc taa tcctcgagag atccggatta g 3006  
 Pro Arg

<210> 22  
 <211> 994  
 <212> PRT  
 <213> artificial

5

<220>  
 <223> constructo sintético

10

<400> 22

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser  
 1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala  
 20 25 30

Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser  
 35 40 45

Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Thr Ile His Trp Val Arg Arg Arg Pro  
 50 55 60

Gly His Asp Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Cys  
 65 70 75 80

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

Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu  
 100 105 110

ES 2 833 162 T3

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

ES 2 833 162 T3

Asp His Ala Ile His Trp Ala Lys Gln Lys Pro Glu Gln Gly Leu Glu  
 370 375 380  
 Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr Asn Glu  
 385 390 395 400  
 Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr  
 405 410 415  
 Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr  
 420 425 430  
 Phe Cys Lys Arg Ser Tyr Tyr Gly His Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
 435 440 445  
 Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 450 455 460  
 Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val  
 465 470 475 480  
 Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile  
 485 490 495  
 Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln  
 500 505 510  
 Leu Leu Val Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg  
 515 520 525  
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser  
 530 535 540  
 Leu Gln Ser Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly  
 545 550 555 560  
 Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Val Asp  
 565 570 575  
 Pro Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 580 585 590  
 Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
 595 600 605  
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
 610 615 620

ES 2 833 162 T3

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
 625 630 635 640  
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
 645 650 655  
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
 660 665 670  
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
 675 680 685  
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
 690 695 700  
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu  
 705 710 715 720  
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
 725 730 735  
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 740 745 750  
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
 755 760 765  
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
 770 775 780  
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
 785 790 795 800  
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp Pro Lys Phe Trp Val  
 805 810 815  
 Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr  
 820 825 830  
 Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu  
 835 840 845  
 His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg  
 850 855 860  
 Lys His Tyr Gln Ala Tyr Ala Ala Ala Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg



## REIVINDICACIONES

1. Polipéptido recombinante que es un receptor de antígeno quimérico (CAR) que contiene al menos los siguientes dominios en orden, comenzando desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal:
  - a.) un primer dominio que contiene i) la unidad de anticuerpo anti-CD30 de cadena sencilla de HRS3-scFv de SEQ ID NO: 2 y ii) una unidad de anticuerpo que es una unidad de anticuerpo de scFv que se une específicamente a un antígeno asociado a tumor presente en la superficie de una célula diana predeterminada;
  - b.) opcionalmente, un dominio espaciador;
  - c.) un dominio transmembrana; y
  - d.) un dominio de señalización citoplásmica.
2. Polipéptido recombinante que es un CAR que contiene al menos los siguientes dominios en orden, comenzando desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal:
  - a.) un primer dominio que contiene i) una unidad de anticuerpo que es una unidad de anticuerpo de scFv que se une específicamente a un antígeno asociado a tumor presente en la superficie de una célula diana predeterminada; y ii) una unidad de anticuerpo anti-CD30 de cadena sencilla de HRS3-scFv de SEQ ID NO: 2,
  - b.) opcionalmente, un dominio espaciador;
  - c.) un dominio transmembrana; y
  - d.) un dominio de señalización citoplásmica.
3. Polipéptido recombinante que es un CAR según la reivindicación 1 ó 2, que comprende además una secuencia líder que se ubica de manera N-terminal con respecto al primer dominio.
4. Polipéptido recombinante que es un CAR según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el dominio espaciador es un dominio CH2 CH3 de IgG1 de SEQ ID NO: 6 u homólogos del mismo que tiene al menos el 95% de identidad con el mismo.
5. Polipéptido recombinante que es un CAR según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el dominio transmembrana se deriva de CD28.
6. Polipéptido recombinante que es un CAR según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el dominio intracelular contiene un CD3zeta o una cadena de señalización de I-gamma del receptor de Fc-épsilon o una unidad coestimuladora.
7. Polipéptido recombinante que es un CAR según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el dominio intracelular es un dominio de señalización de CD28.
8. Polipéptido recombinante que es un CAR según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la unidad de anticuerpo de scFv se une a un antígeno asociado a tumor seleccionado de antígeno carcinoembrionario (CEA), CA19-9, CA72-4 (TAG-72), PSCA, Muc-1, HMW-MAA, melanotransferrina p97, receptor de acetilcolina fetal, ErbB2 (Her2/neu), proteína de resistencia a múltiples fármacos (MDR), CD19, CD20 y TOSO.
9. Molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para el polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. Vector que comprende la secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 9.
11. Célula aislada que contiene un vector según la reivindicación 10 o una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 9.
12. Célula aislada según la reivindicación 12, que es una célula T que expresa en su superficie el CAR según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
13. Célula T aislada que expresa en su superficie

a.) un primer receptor de antígeno quimérico que tiene en su dominio extracelular el anticuerpo anti-CD30 de cadena sencilla de HRS3-scFv de SEQ ID NO: 2 y

5 b.) un segundo receptor de antígeno quimérico que tiene en su dominio extracelular una unidad de anticuerpo que es una unidad de anticuerpo de scFv que se une específicamente a un antígeno asociado a tumor presente en la superficie de una célula diana predeterminada.

10 14. Célula T aislada según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13, para su uso en el tratamiento de cáncer, mediante lo cual dicho cáncer es un cáncer que expresa el antígeno al que se dirige el anticuerpo del antígeno antitumoral.

**Composición modular de CAR con doble especificidad CEA/CD30**

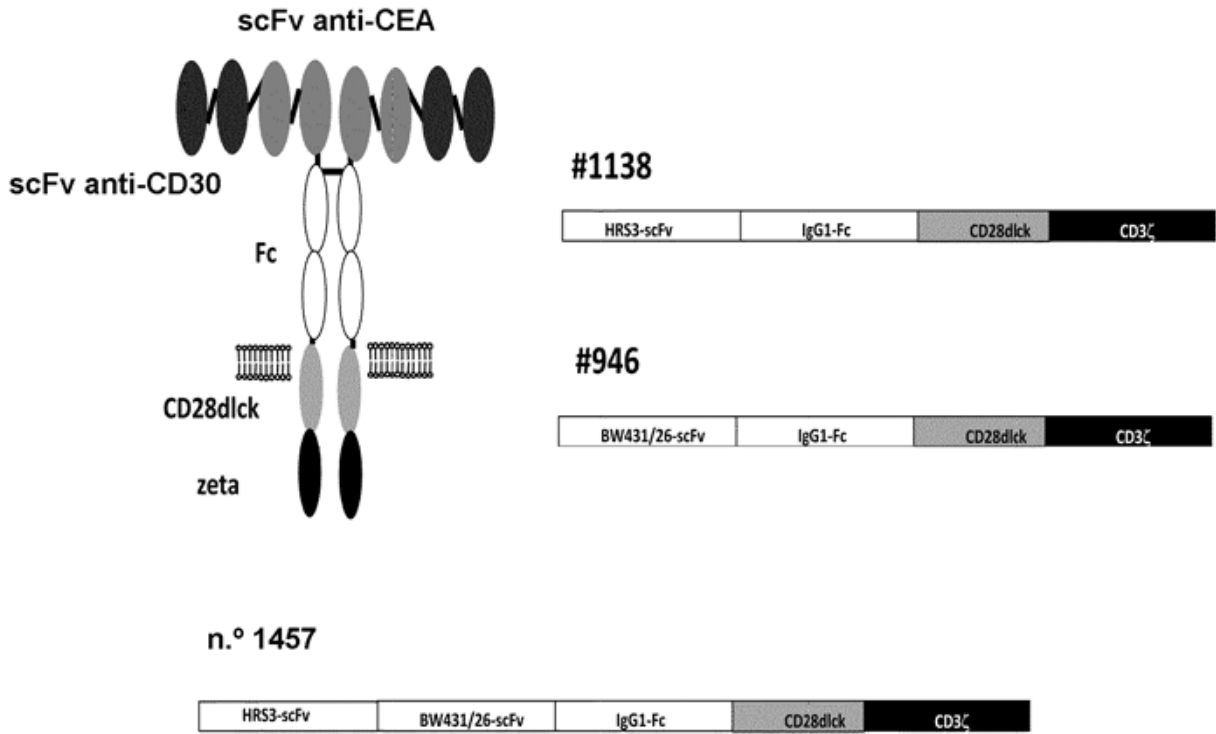


Figura 1

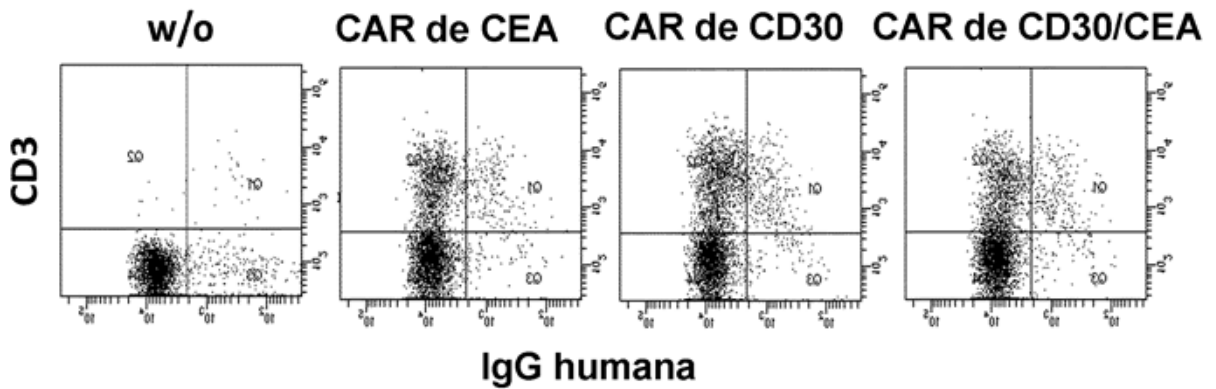


Figura 2

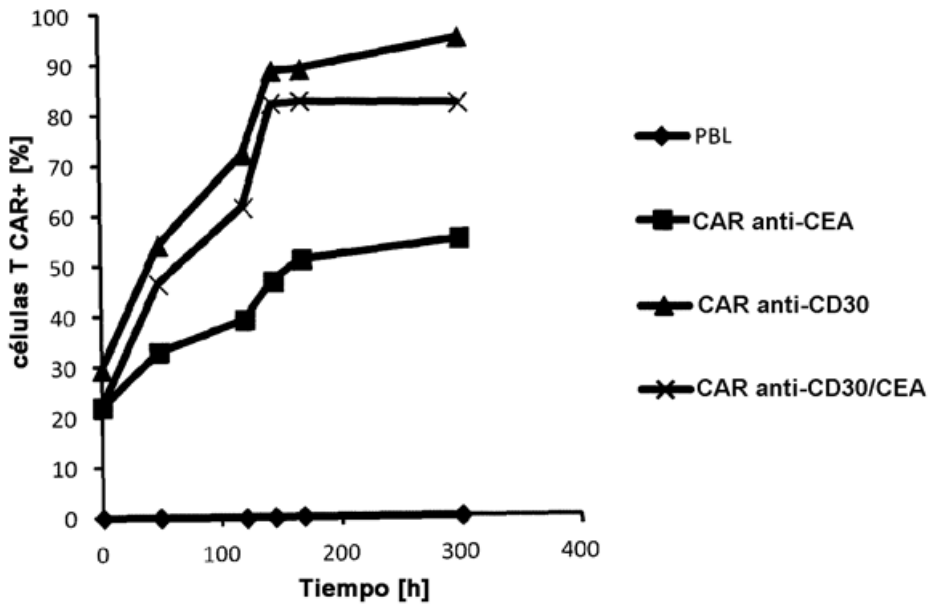


Figura 3

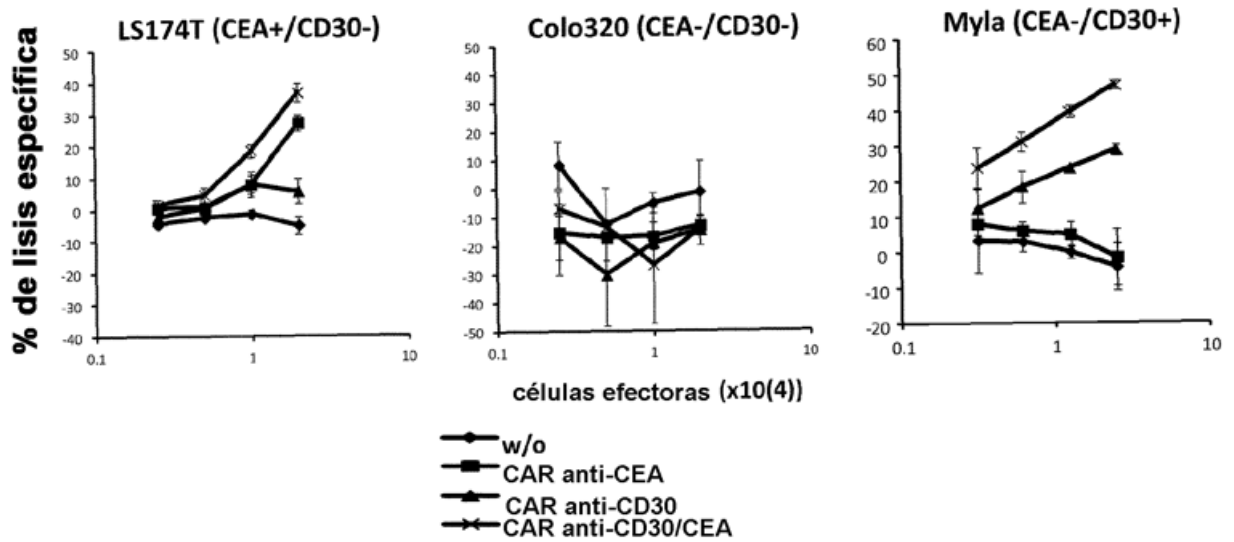


Figura 4

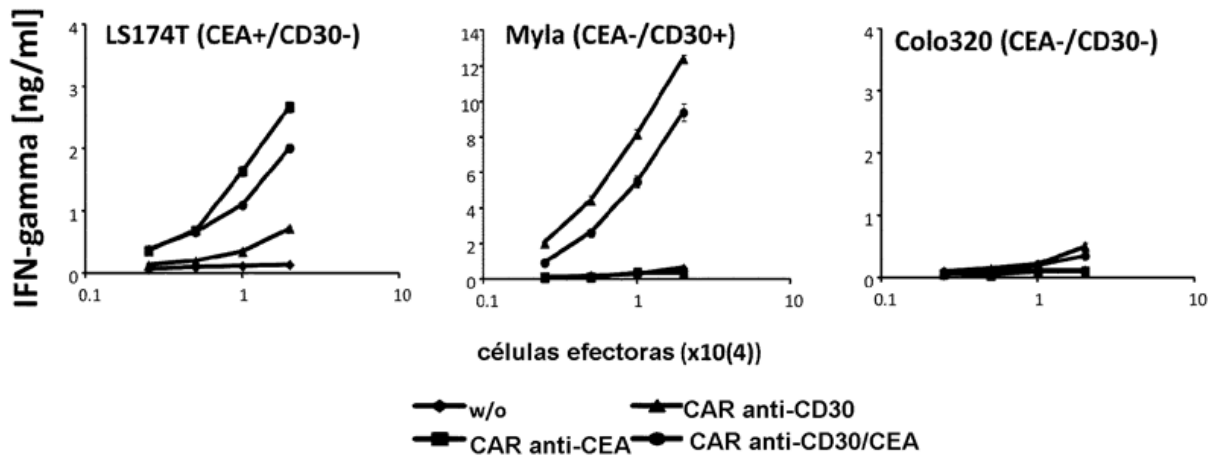


Figura 5

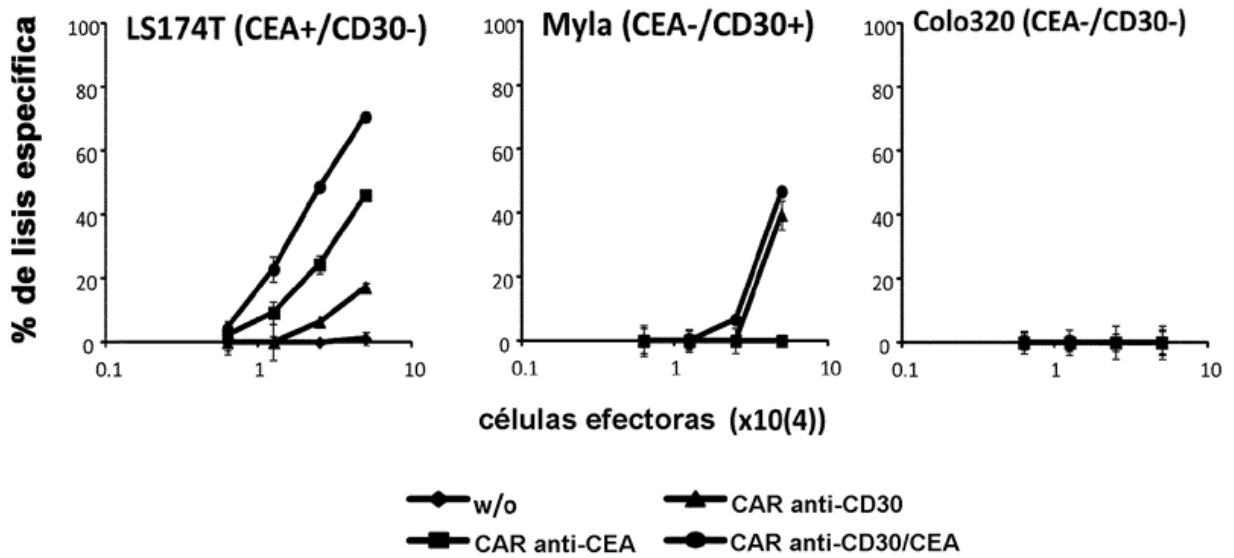


Figura 6

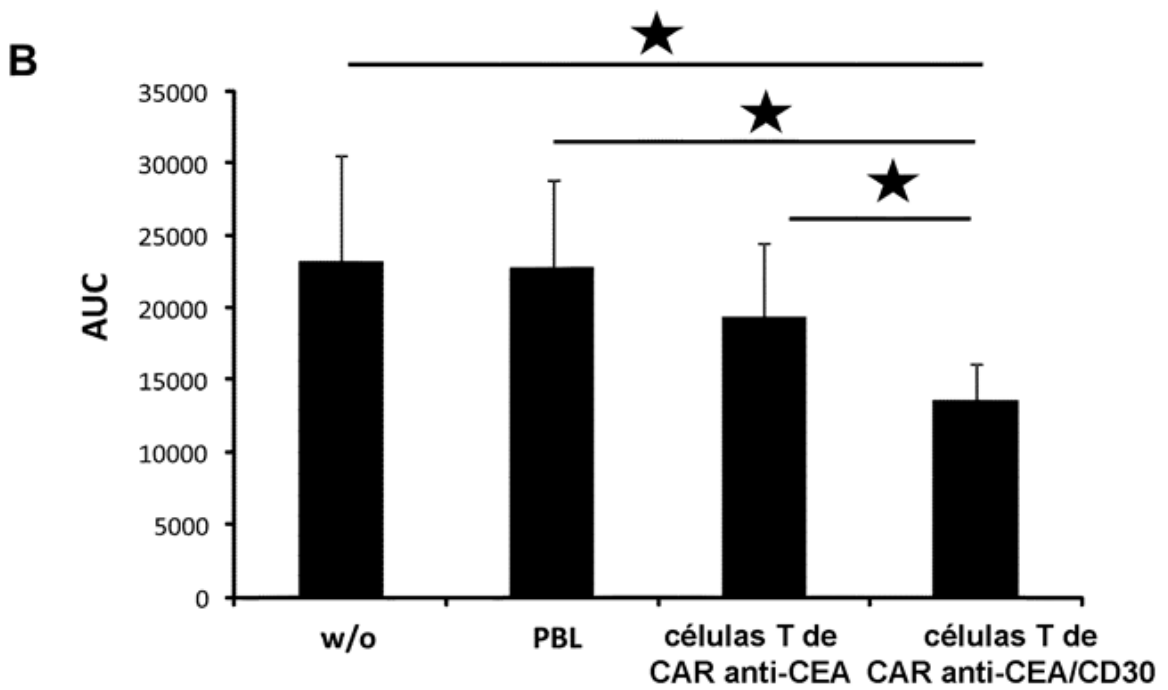
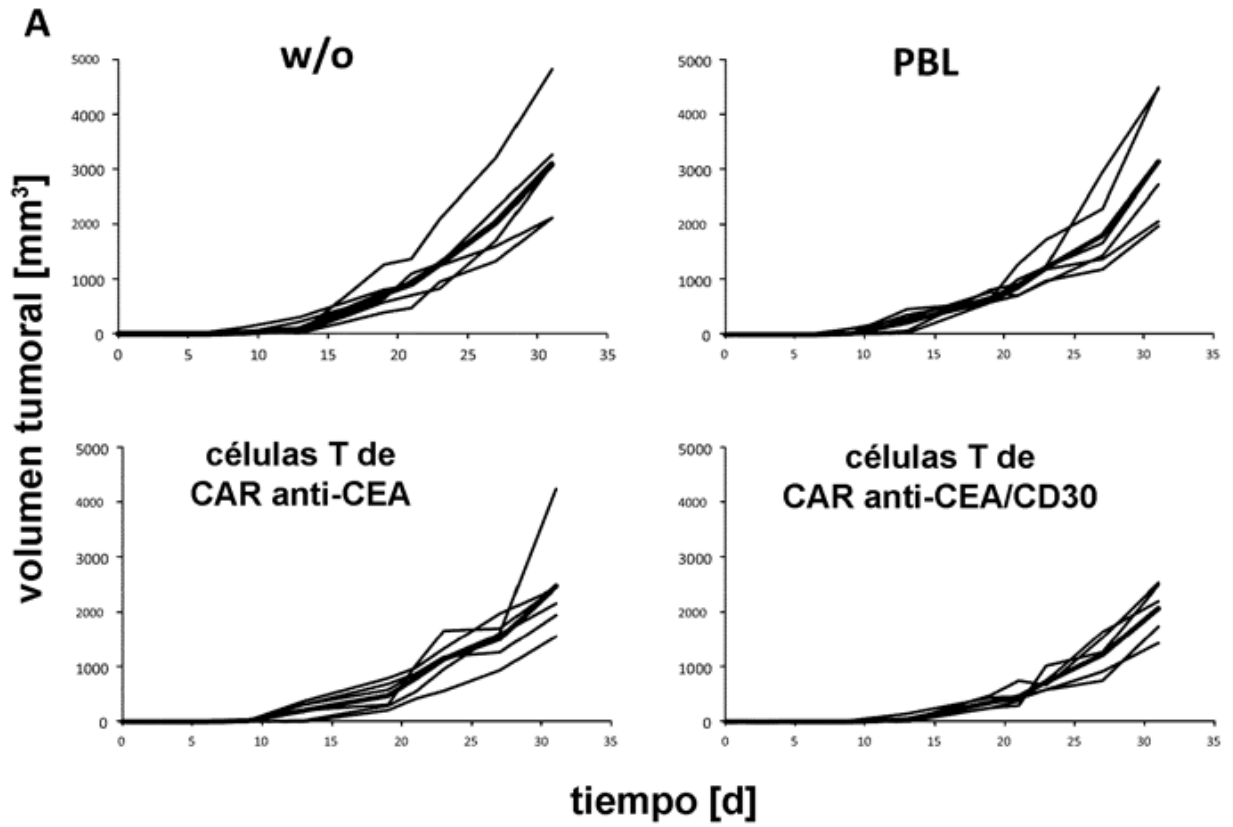


Figura 7

**A**

n.º 946: CAR anti-CEA

BW431/26-scFv	IgG1-Fc	CD28dlck	CD3ζ
---------------	---------	----------	------

n.º 1457: CAR anti-CD30/CEA

HRS3-scFv	BW431/26-scFv	IgG1-Fc	CD28dlck	CD3ζ
-----------	---------------	---------	----------	------

n.º 1576: CAR anti-CD25/CEA

anti-CD25	BW431/26-scFv	IgG1-Fc	CD28dlck	CD3ζ
-----------	---------------	---------	----------	------

**B**

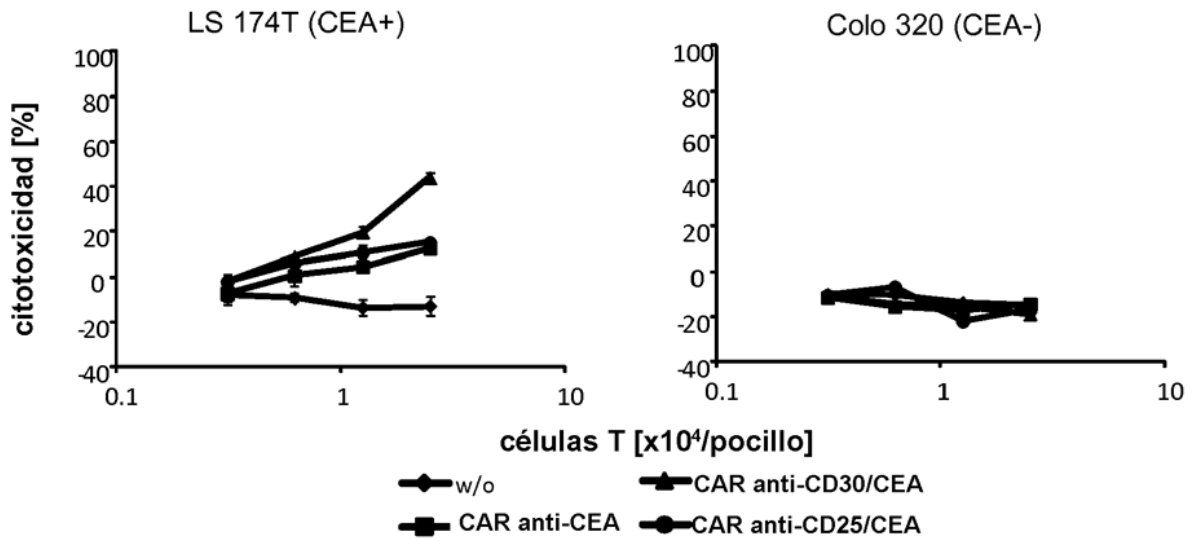
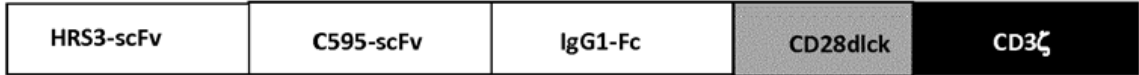


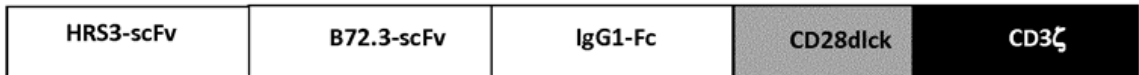
Figura 8

A

n.º 1587: CAR anti-CD30/Muc1



n.º 1650: CAR anti-CD30/TAG-72



B

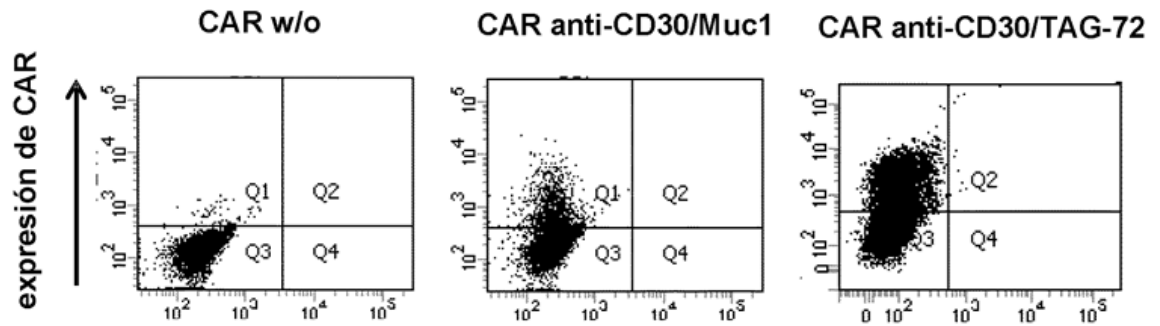


Figura 9