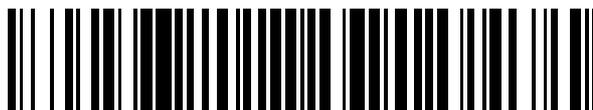


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 421**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2009 E 09810530 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2015 EP 2331566**

54 Título: **Método y composiciones para el funcionamiento potenciado del efector antitumoral de células T**

30 Prioridad:

26.08.2008 US 91915 P

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

09.12.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

JENSEN, MICHAEL

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 553 421 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

Método y composiciones para el funcionamiento potenciado del efector antitumoral de células T

Declaración relacionada con la investigación patrocinada por el gobierno federal

5 Esta invención se hizo con el apoyo gubernamental en la forma del Cancer Center Support Grant no. P30-CA33572-21 del Department of Health and Human Services, National Institutes of Health de los Estados Unidos. El gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos en la invención.

Antecedentes de la invención

1. Campo técnico

10 La invención se relaciona con el campo de la biomedicina y específicamente con métodos útiles para la terapia del cáncer. En particular, la invención se relaciona con un receptor de antígeno quimérico (CAR) para estrategias inmunoterapéuticas de CTL específicas para el cáncer, que incluyen el uso de los linfocitos T genéticamente modificados que expresan inmunorreceptores quiméricos en el tratamiento de tumores de cerebro humanos y otros tipos de cáncer.

2. Descripción de la técnica anterior

15 Se han investigado inmunoterapias basadas en células T específicas para tumores para el tratamiento antitumoral, sin embargo, las células T sufren del problema de que no sobreviven ni permanecen activas *in vivo* durante un período lo suficientemente largo. Frecuentemente las células T, transferidas de forma adoptiva no tienen la potencia y duración deseadas para matar células tumorales. Por lo tanto, hay una necesidad en la técnica para terapias de cáncer específicas de tumores con funcionamiento antitumoral a largo plazo.

20 Las inmunoterapias dirigidas al cáncer tradicionalmente se centran en la obtención de respuestas de CD8⁺ CTL. Sin embargo, la estimulación de las respuestas de células T CD4⁺ (auxiliares) también es importante para la inmunoterapia exitosa contra el cáncer. Las células T CD4⁺ pueden influir en las respuestas de CTL específicas de tumores naturales, directa o indirectamente, a través de condicionamiento de antígeno profesional que presenta células a través de CD40-CD40L, y a través de la producción de citoquinas tales como IL2 e IFN- γ . Los mecanismos efectores citocidas utilizados por las células T CD4⁺ son mediados, ya sea a través de la liberación de citoquinas que activan los receptores de muerte en la superficie de células tumorales, o a través de contacto directo de células donde Fas/FasL, el ligando que induce la apoptosis relacionado con TNF (TRAIL), o rutas dependientes de perforina granzima median la apoptosis de células tumorales. Estas células auxiliares pueden aumentar la temprana expansión clonal y la generación de efectores de CTL CD8⁺ primarios, y también puede afectar tanto la generación como la expansión de células T CD8⁺ de memoria funcional.

35 La activación completa de las células T CD4⁺ naturales requiere tanto de una señal específica del antígeno a través del acoplamiento del complejo receptor/CD3 de células T con complejos clase II de péptido/MHC apropiados como de señales coestimuladoras. Estas señales coestimuladoras por lo general son suministradas por ligandos que se expresan selectivamente en células que presentan antígenos especializados. Se cree que la coestimulación de células T ayuda a mantener la tolerancia a los antígenos propios normales expresados por los tejidos que no suministran esta señal secundaria. Puesto que la mayoría de las células tumorales, similar a los tejidos normales, no expresan MHC clase II o moléculas coestimuladoras, es lógico pensar que también ellos normalmente no promueven la estimulación de las células T CD4⁺ directamente. Esta teoría está apoyada por varios estudios que han demostrado una inmunidad antitumoral mediada por células T potenciada por la vacunación con células tumorales que fueron transfectadas con el ligando B7-1 coestimulador.

40 Mientras que la alteración de la expresión de células tumorales de las moléculas coestimuladoras es una manera de ayudar a conducir la activación de células T, serían muy deseables estrategias alternativas, particularmente estrategias que involucren el permitir que la célula T reciba y actúe sobre las señales coestimuladoras sin la necesidad de ligandos coestimuladores reales.

45 La WO2008/095141 divulga células T reguladoras redirigidas dotadas con especificidad hacia un antígeno objetivo seleccionado o ligando y su uso en la supresión de enfermedades autoinmunes. La US2003/0171546 A1 se refiere a inmunorreceptores de transmembrana quiméricos para redireccionar la especificidad de antígeno de las células T, con aplicación al tratamiento de una variedad de cánceres. En particular, la US2003/0171546 A1 divulga un receptor de antígeno quimérico (CAR) específico del tumor con un dispositivo de señalización coestimulador de CD28. La US2005/0113564 A1 divulga un método para potenciar la actividad de un receptor de antígeno quimérico contra un tumor, que comprende adicionar ya sea un CD28 o un dominio de señalización de 4-1BB a dicho receptor.

Resumen de la invención

De acuerdo con lo anterior, la presente invención provee un receptor de antígeno quimérico (CAR) como se reivindica en la reivindicación 1 más adelante, para el funcionamiento efector antitumoral potenciado de las células T CD4 y CD8⁺ para inmunoterapia del cáncer. Los inmunorreceptores de transmembrana quimérica (denominados receptores de antígeno quimérico o "CARs") comprenden un dominio extracelular, una región transmembrana y un dominio de señalización intracelular. El dominio extracelular está constituido de un ligando de receptor soluble (que es específico para un antígeno tumoral objetivo u otra molécula de la superficie celular del tumor) enlazado a una región de soporte opcional capaz de atar el dominio extracelular a una superficie celular. El dominio de señalización intracelular contiene el dominio de señalización de la cadena zeta del complejo CD3 humano (CD3) y los dominios de señalización coestimuladora de CD28 y de 4-1BB. El dominio extracelular contiene un elemento de reconocimiento que permite que el CAR, cuando se expresa en la superficie de una célula T, para dirigir la actividad de células T a aquellas células que expresan un receptor o ligando para el cual este elemento de reconocimiento es específico. Por ejemplo, un CAR que contiene un dominio extracelular que contiene un elemento de reconocimiento específico para un antígeno tumoral puede dirigir la actividad de células T a las células tumorales que portan este antígeno. La región intracelular permite a la célula T recibir señales coestimuladoras. Los dominios de señalización coestimuladores son CD28 y 4-1BB. El receptor quimérico humano comprende una región transmembrana de CD4, un Fc de IgG₄ humano y un receptor de IL13 o ligando que es específico del tumor. La molécula de IL13 contiene la mutación E13Y, como en IL13-CD28-41BBζ.

Las realizaciones de la invención también abarcan los linfocitos T aislados que expresan el CAR discutido aquí. Además, las realizaciones de la invención incluyen métodos de inmunoterapia del cáncer que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo tales linfocitos T, que incluyen como tratamientos para cualquiera de los siguientes tipos de cáncer: glioblastoma, meduloblastoma, cáncer de seno, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, cáncer de ovario, sarcoma de Kaposi, leucemia mielogenosa aguda, y enfermedades malignas de linaje B.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una representación esquemática de las moléculas de proteína del receptor de antígeno quimérico (CAR) de IL13ζ e IL13-CD28-41BBζ.

La Figura 2 muestra las ubicaciones de cebadores de ejemplo para la construcción de CAR de IL13ζ en la secuencia de IL13 nativa como se indica. Las flechas indican la posición de los cebadores en la secuencia de IL13.

Figura 3 (dada como las figuras 3A-3C) provee una secuencia de nucleótidos que codifican la IL13 zetaquina de ejemplo (SEQ ID NO: 5, cadena superior; SEQ ID NO: 6, cadena inferior). Los segmentos de ADN en la secuencia incluyen el péptido de señalización alfa GM-CSFR (SEQ ID NO: 7), IL13 (E13Y) (SEQ ID NO: 8), IgG₄ (SMP) (SEQ ID NO: 9), CD4tm (SEQ ID NO: 10) y CD3zeta (SEQ ID NO:11). La secuencia completa de aminoácidos se provee como SEQ ID NO: 4.

La Figura 4 es un mapa del vector IL13zetaquina/HyTK-pMG. Una secuencia de ejemplo de tal vector se provee en la Figura 5.

Figura 5 (dada como las figuras 5A-5L) provee la secuencia de un vector de ADN plásmido de ejemplo (SEQ ID NO: 13, cadena superior; SEQ ID NO: 14, cadena inferior). Una secuencia de aminoácidos de IL13zetaquina (SEQ ID NO: 15) y una secuencia de aminoácidos de HyTK (SEQ ID NO: 16) también se indican. Los segmentos de ADN que componen la secuencia completa incluyen hEF1p (nucleótidos 6-549; SEQ ID NO: 41), IL13 zetaquina (nucleótidos 690-2183; SEQ ID NO: 42), sv40pAn tardío (nucleótidos 2230-2498; SEQ ID NO: 43), Ori ColEI (nucleótidos 2499-3245; SEQ ID NO: 44), SpAn (nucleótidos 3246-3432; SEQ ID NO: 45), HCMV 1Aprom (nucleótidos 3433-4075; SEQ ID NO: 46), HyTK (nucleótidos 4244-6319; SEQ ID NO: 47) y BGh pAna (nucleótidos 6320-6618; SEQ ID NO: 48).

La Figura 6 contiene dos representaciones esquemáticas de constructos de plásmido lineales del CAR de ejemplo. La Figura 6A muestra un constructo de IL13ζ y la Figura 6B muestra un constructo de IL13 CD28-41BBζ.

La Figura 7 muestra el análisis de transferencia Western de lisados celulares derivados de células T CD4⁺ transfectadas en forma simulada, por IL13ζ- e IL13-CD28-41BBζ para la expresión del CAR utilizando un mAb específico de CD3ζ antihumano de ratón.

La Figura 8 es un panel de ocho análisis de citometría de flujo que comparan el fenotipo de las células CD4⁺ en volumen que expresan IL13ζ- e IL13- CD28-41BBζ.

La Figura 9 es un panel de seis gráficos que muestran los resultados de citometría de flujo de tinción de la superficie de HLA-A2 y HLA-DR (moléculas MHC), IL13Rα2 y las moléculas coestimuladoras CD80, CD86, CD137 y-L (4-1BBL) (histogramas rellenos) como se indica, en comparación con controles de isotipo (histogramas abiertos) en las células objetivo de glioma U87.

La Figura 10 es una serie de inmunotransferencias que muestran los resultados de un ensayo de quinas para determinar la cinética de la activación de JNK y p38 (3A) y AKT (3B), que se mide a través de la fosforilación de sus respectivos sustratos (esto es, P-cJun (proto-oncógeno de c-Jun fosforilado), p-GSK3 (glicógeno sintasa quinasa 3 fosforilada) y P-ATF2 (factor 2 de transcripción de activación fosforilado)).

- 5 La Figura 11 muestra la polarización de Th₁ potenciada de las células T CD4⁺ de IL13-CD28-41BBζ⁺ en términos ARNm de citoquina Th₁ de células T (Figura 11A) y la producción de proteína de citoquinas Th₁ y Th₂ (Figura 11B).

- 10 La Figura 12A provee los datos que muestran una actividad citotóxica potenciada de las células T IL13-CD28-41BBζ⁺ CD4⁺ (■) contra objetivos U87 en comparación con la de las células T CD4⁺ de IL13ζ⁺ (○) en la relación indicada E:T en un ensayo de citotoxicidad de luciferasa de 4 horas (LCA). La Figura 12B muestra datos similares para las células T IL13-CD28-41BBζ⁺ CD4⁺ (barras negras) y las células T IL13ζ⁺ CD4⁺ (barras blancas) cocultivadas durante 48 horas en una relación E:T de 2:1, y luego cocultivadas de nuevo durante 48 horas adicionales después de la adición de objetivos frescos en la misma relación E:T. La Figura 12C provee los datos obtenidos con las imágenes de vídeo de las células T que expresan el CAR indicado de cocultivadas con células U87 adherentes, lo cual indica el número de células viables por imagen.

- 15 La Figura 13 provee datos de flujo que muestran el efecto antitumoral sostenido contra xenoinjertos de glioblastoma establecidos *in vivo* por las células T CD4⁺ de IL13-CD28-41BBζ⁺. También se muestran los resultados observados con células T transfectadas con IL13ζ y simuladas.

La Figura 14 provee la secuencia de IL13-IgG₄-cd28tm-CD28gg-Zeta (CO) (SEQ ID NO: 36).

- 20 La Figura 15 proporciona la secuencia de IL13-IgG₄-cd4tm-CD28-4-1BB-Zeta, también denominado aquí como IL13-CD28-41BBζ utilizada/discutida anteriormente con respecto a los ejemplos a continuación (SEQ ID NO: 37). Esta secuencia se utilizó para alterar genéticamente las células T para expresar el CAR de IL13-CD28-41BBζ como se describe y se utiliza en las figuras 1, 6, 7, 8, 10, 11, 12 y 13.

La figura 16 provee la secuencia de IL13-IgG₄-cd28tm-CD28-Ox40-Zeta (SEQ ID NO: 38).

La Figura 17 provee la secuencia de IL13-IgG₄-cd28tm-CD28gg-4-1BB-Zeta (SEQ ID NO: 39).

- 25 La Figura 18 provee la secuencia de IL13-IgG₄-cd28tm-CD28gg¹⁹⁹-4-1BB-Zeta (SEQ ID NO: 40).

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

- 30 La inmunoterapia adoptiva que utiliza linfocitos T que expresan receptores de antígenos quiméricos (CARs) específicos de tumores puede ser una estrategia terapéutica poderosa para el tratamiento del cáncer. Los CAR se componen de un elemento de reconocimiento específico extracelular (tal como un receptor que se enlaza a un antígeno tumoral) enlazado a través de un dominio transmembrana al dominio de señalización citoplásmico de CD3ζ. Por lo tanto, estos receptores son capaces tanto de unirse al antígeno como para transducir activación de células T, independiente de la restricción de MHC. Así, los CAR son inmunorreceptores "universales" que pueden tratar una población de pacientes con tumores positivos al antígeno, independientemente de su genotipo HLA.

- 35 De acuerdo con realizaciones de esta invención, los CAR contienen el dominio de señalización para CD3 y los dominios de señalización de uno o más receptores coestimulantes que promueven además el reciclaje, la supervivencia y/o expansión de células transferidas adoptivamente que expresan los CAR, además de receptores específicos que permiten a las células acoplar objetivos tales como tumores. Los dominios de señalización de los receptores coestimuladores son las porciones intracelulares de cada proteína del receptor que generan la señal de activación en la célula. Ejemplos son los aminoácidos 180-220 de la molécula CD28 nativa y los aminoácidos 214-255 de la molécula 4-1BB nativa. Un CAR especialmente preferido comprende un elemento de reconocimiento extracelular que es específico para un receptor único de la superficie celular del cáncer, es estable *in vivo* y tiene una baja inmunogeneidad. La derivación a partir de una molécula de señal celular soluble de origen natural ayuda a lograr estos objetivos.

- 45 El término "CAR" se refiere a un receptor de antígeno quimérico que es una biomolécula recombinante que contiene un dominio de reconocimiento extracelular, una región transmembrana, y un dominio de señalización intracelular. El término "antígeno", por lo tanto, no se limita a moléculas que se enlazan a los anticuerpos, sino a cualquier molécula que se puede enlazar específicamente a cualquier receptor. "Antígeno" se refiere así al dominio de reconocimiento del CAR. El dominio de reconocimiento extracelular (también denominado como el dominio extracelular o simplemente por el elemento de reconocimiento que contiene) comprende un elemento de reconocimiento que se enlaza específicamente a una molécula presente en la superficie celular de una célula objetivo. La región transmembrana ancla el CAR en la membrana. El dominio de señalización intracelular comprende el dominio de señalización de la cadena zeta del complejo CD3 humano y comprende opcionalmente uno o más dominios de señalización coestimuladoras.

Un CAR que contiene el dominio de IL13 con la mutación E13Y (IL13(E13Y)) y el dominio de señalización de la cadena zeta de CD3 se denomina aquí como "IL13ζ." Este término incluye cualquier receptor de antígeno quimérico (CAR) que contenga un dominio de reconocimiento extracelular de IL13 (un dominio que reconoce específicamente IL13Rα2 en las células tumorales) una región transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de cadena zeta de CD3. Ejemplos no limitantes de tales CAR se proveen en los Ejemplos 8-12. Un CAR que contiene IL13(E13Y) y contiene también los dominios intracelulares coestimuladores opcionales CD28 y 4-1BB se denomina aquí "IL13-CD28-41BBζ".

Las personas expertas reconocerán que cualquier secuencia de nucleótidos que codifica IL13(E13Y) también sería adecuado para este mismo propósito. La secuencia no mutada del dominio de señalización IL13 también es adecuada. Cualquier secuencia que codifica IL13 o IL13(E13Y) incluyendo variantes con 90%, 95%, 98% o 99% de homología con la secuencia nativa se puede utilizar aquí. Tales secuencias que son útiles para reconocer específicamente un antígeno tumoral del receptor de IL13 tal como IL13Rα2, por lo tanto, incluyen las codificadas por el ácido nucleico nativo (véase Smernov et al, Gene 155:277-281, 1995, 1.995, cuyas divulgaciones se incorporan aquí como referencia), la misma secuencia de ácido nucleico que carece de la mutación E13Y, secuencias que son 95%, 98% o 99% homólogas con estas secuencias, secuencias más largas que comprenden aquellas secuencias, pero también incluyen nucleótidos adicionales en el extremo 3' o 5', por ejemplo, cualquier número de nucleótidos o codones adicionales, tales como 3, 6, 9, 12 o más nucleótidos, o hasta aproximadamente 12, 20, 50 o 100 nucleótidos adicionales, y cualquier secuencia que codifica la misma secuencia de aminoácidos que estos ácidos nucleicos debido a la degeneración del código genético. En particular, las secuencias que son de codones optimizados (CO) para la expresión por el anfitrión deseado se contemplan como parte de la invención.

Elementos de reconocimiento solubles como los usados en esta invención se derivan de polipéptidos sintetizados *de novo*, como se describe para la secuencia de codificación de IL13 (E13Y) en el Ejemplo 1 o de polipéptidos de librerías combinatorias tales como librerías de despliegue de fagos o librerías sintetizadas químicamente.. Elementos de reconocimiento solubles preferidos son de origen humano y por lo tanto son no inmunogénicos, pero pueden ser adaptados en la afinidad o especificidad a través de la mutagénesis. Tras su expresión en las células T, los elementos de reconocimiento solubles son capaces de enlazarse a un elemento objetivo en la célula objetivo (por ejemplo una célula tumoral, pero no en ningún grado apreciable en las células no objetivo), de tal manera que da como resultado la activación de células T. Así, los elementos de reconocimiento solubles que son adecuados para esta invención tienen ciertas ventajas sobre los fragmentos de anticuerpos o moléculas de adhesión celular para especificidad objetivo en los CAR de la invención, puesto que son más propensos a ser estables en el ambiente extracelular, no antigénico, y más selectivos, y por lo tanto se prefieren. Ejemplos de elementos receptores solubles adecuados incluyen factores de crecimiento autocrinos y paracrinos, quimioquinas, citoquinas, hormonas y ligandos diseñados de moléculas pequeñas artificiales que presentan la especificidad requerida. Las secuencias de ligando natural pueden ser diseñadas para incrementar su especificidad para una célula objetivo particular. La selección de un elemento de reconocimiento para uso en un CAR particular se rige por la naturaleza de la célula objetivo, y las cualidades discutió anteriormente. En una realización preferida de la invención, el CAR explota la expresión restringida al tumor de IL13Rα2 por glioma maligno, carcinoma de células renales y otros tumores mediante el uso como el elemento de reconocimiento de un mutante de IL13 (E13Y) para dirigir las células T específicamente a las células tumorales que expresan IL13Rα2. Se pueden crear elementos de reconocimiento análogos que son específicos para cualquiera de una variedad de tipos de células cancerosas que expresan selectivamente antígenos receptores o cualquier molécula específica sobre sus superficies celulares, para los que se conocen elementos de reconocimiento selectivos o pueden ser diseñados.

Ejemplos de regiones de soporte adecuado (transmembrana) para uso con la invención incluyen las regiones constantes (Fc) de inmunoglobulinas, CD8a humana, y enlazadores artificiales que sirven para mover la unidad estructural de direccionamiento lejos de la superficie celular para mejorar el acceso y el enlazamiento en las células objetivo. Una región de soporte preferido es la región Fc de una IgG (tales como IgG₄). Ejemplos de dominios transmembrana adecuados incluyen los dominios transmembrana de los marcadores de leucocitos de CD, preferiblemente la de CD4 o CD28. Ejemplos de dominios de señalización del receptor intracelular incluyen el complejo receptor de antígeno de células T, preferiblemente la cadena zeta de CD3, sin embargo, cualquier región transmembrana suficiente para anclar el CAR en la membrana se puede utilizar. Las personas de experiencia son conscientes de las numerosas regiones transmembrana y los elementos estructurales (tales como regiones de aminoácidos lipofílicos) que producen dominios transmembrana en numerosas proteínas de la membrana y por lo tanto puede sustituir cualquier secuencia conveniente. Los receptores de señalización coestimuladora de células T adecuados para mejorar la función y la actividad de las células que expresan CAR incluyen, pero no se limitan a, CD28 y 4-1 BB también conocido como (CD 137), y OX-40.

La señalización a través de CD28 se requiere para la producción y proliferación de IL2, pero no juega un papel primordial en el mantenimiento de la función y la actividad de las células T. 4-1 BB (un miembro de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral expresado después de la activación de CD28) y OX-40 están involucrados en guiar la supervivencia a largo plazo de las células T, y la acumulación de células T. Los ligandos para estos receptores típicamente están expresados en las células que presentan antígenos profesionales, tales como células dendríticas y macrófagos activados, pero no en las células tumorales. Expresando un CAR que incorpora dominios de señalización de CD28 y/o 4-1BB en las células T CD4⁺ potencia la actividad y la potencia antitumoral de esas

células en comparación con las que expresan un CAR que contiene solamente el dominio de señalización de CD3 ζ . Preferiblemente, los CAR de la invención contienen dominios de señalización tanto CD28 como 4-1BB.

5 Para que el CAR apunte a las células tumorales, contienen una molécula de enlazamiento extracelular que enlaza un marcador de superficie tumoral y preferiblemente se enlaza específicamente a una molécula única de superficie del tumor. Algunos tipos de cáncer expresan o sobreexpresan moléculas del sistema inmune. Los gliomas, por ejemplo, expresan receptores de IL13, y en particular, los receptores de IL13 de alta afinidad. Sin embargo, a diferencia del complejo trimolecular del receptor de IL13 utilizado por el sistema inmune, (que consiste en el IL13R α 1, el IL4R β , y γ c), las células de glioma sobreexpresan una cadena IL13R α 2 única capaz de enlazarse a IL13 independientemente del requerimiento para IL4R β o γ c44. Al igual que su homólogo IL4, el IL13 tiene actividad inmunorreguladora pleotrópica fuera del SNC. Tanto el IL13 como el IL4 estimulan la producción de IgE por los linfocitos B y suprimen la producción de citocinas proinflamatorias por los macrófagos.

10 Estudios detallados que utilizan autorradiografía con IL 13 radiomarcado han demostrado abundante enlazamiento de IL 13 sobre casi todos los tejidos de glioma maligno estudiados. Este enlazamiento es altamente homogéneo dentro de las secciones del tumor y en el análisis de una célula individual. Sin embargo, el análisis de la sonda molecular específico para ARNm de IL13R α 2 no detectó la expresión del receptor específico de glioma por elementos cerebrales normales y autorradiografía con IL13 radiomarcado tampoco pudo detectar el enlazamiento de IL13 específico en el SNC normal. Estos estudios sugieren que el receptor de IL13R α 1/IL4 β / γ c compartido no se expresa de forma detectable en el SNC normal. Por lo tanto, IL13R α 2 es un objetivo de la superficie celular muy específico para glioma y es un objetivo altamente adecuado para esta invención. Las personas con experiencia son conscientes de otros objetivos adecuados para los CAR, que se expresan o sobreexpresan en las células que van a ser direccionadas y preferiblemente no se expresan o se expresan en un grado mucho menor, en otras células. Otro ejemplo de un objetivo específico de tumor adecuados para el direccionamiento con los CAR es el receptor de IL3 (IL3R; por ejemplo, expresado en las células de leucemia mieloide aguda (AML).

15 El enlazamiento de citotoxinas basadas en IL13 al complejo receptor de IL13R α 1/IL4 β / γ c ampliamente expresado, tiene, sin embargo, el potencial de mediar toxicidades no deseadas a los tejidos normales fuera del SNC, y así limita la administración sistémica de estos agentes. Una sustitución de aminoácido en la hélice A de IL13A alfa en el aminoácido 13 de la tirosina para el ácido glutámico nativo reduce selectivamente la afinidad de IL13 con el receptor de IL13R α 1/IL4 β / γ c. El enlazamiento de este mutante (denominado IL13(E13Y) con IL13R α 2, sin embargo, fue incrementado en relación con el IL13 de tipo silvestre por 50 veces. Así, este análogo de IL13 mínimamente alterado incrementa simultáneamente la especificidad y afinidad de los IL13 para las células de glioma. Por lo tanto, la invención emplea un IL13 que contiene una mutación en el aminoácido 13. Sin embargo, también se puede utilizar el IL 13 que tiene la secuencia natural, y puede ser útil, particularmente en situaciones donde se van a administrar localmente las células T modificadas, tales como mediante inyección directamente en una masa tumoral.

25 Un tipo preferido de CAR para dirigir específicamente tumores que expresan IL13R α 2 está constituido de una citocina mutante de IL13 extracelular en la cual la proteína IL13 contiene una sustitución de tirosina para el ácido glutámico de origen natural en el aminoácido 13 de la proteína (denominado aquí IL13(E13Y)), conectado a una región de soporte de dominio Fc de bisagra de IgG₄ que está fusionado con un dominio transmembrana de CD4 y una secuencia de señalización de CD3 ζ citoplásmico. Véase la Figura 1, lado izquierdo. Este CAR se denomina aquí como "CAR IL13 ζ ". Cuando este CAR también contiene los dominios de señalización de CD28 y el 4-1BB, se denomina como IL13-CD28-41BB ζ . Véase la Figura 1, lado derecho.

30 De acuerdo con la presente invención, un inmunorreceptor puede ser producido por cualquier medio conocido en la técnica, aunque preferiblemente es producido utilizando técnicas de ADN recombinante. Los ácidos nucleicos que codifican las varias regiones del receptor quimérico pueden ser preparadas y ensamblados en una secuencia codificante completa mediante técnicas estándar de clonación molecular conocidas en la técnica (criba de librería genómica, PCR, la ligadura asistida por cebador, mutagénesis dirigida al sitio, etc.) como sea conveniente. La región de codificación resultante se inserta preferiblemente en un vector de expresión y se usa para transformar una línea de células huésped de expresión adecuada, preferiblemente una línea celular de linfocitos T, y lo más preferiblemente una línea celular de linfocitos T autólogos.

35 Brevemente, un CAR IL13 ζ puede construirse usando métodos conocidos como sigue. El IL13(E13Y) de AND mutante IL13(E13Y) se puede sintetizar mediante PCR con cebadores basados en la secuencia conocida ARNm de IL13. La secuencia del gen IL13 completa se informa en Smernov et al, "Tandem arrangement of human genes for interleukin-4 and interleukin-13: resemblance in their organization." Gene 155:277-281, 1995, cuyas divulgaciones se incorporan aquí como referencia. La síntesis de novo del IL13(E13Y), se realizó utilizando el cebador de avance IL13P1 y cuatro cebadores en reverso, IL13P2, IL13P3, IL13P4, y IL13P5, mostrados en la Tabla I, más adelante, y en la Figura 2. Esta secuencia mutante IL 13, puede ser entonces modificada para contener una secuencia 5' líder, si se desea. Un anclaje de transmembrana tal como la transmembrana IgG₄-CD4 humana (IgG₄-CD4tm) y secuencias citoplasmáticas de la cadena de zeta CD3 (CD3 ζ) también se pueden agregar al extremo 3' mediante técnicas de fusión de PCR o cualquier método conveniente. La secuencia de IL13 ζ completa se da en la Figura 3 como un ejemplo de la invención. Los mismos métodos se pueden utilizar para construir moléculas equivalentes

utilizando diferentes elementos de reconocimiento. El constructo final puede entonces ser ligado en cualquier vector de expresión plásmido adecuado. Un vector de expresión plásmido preferido es pMG (disponible de Invivogen™).

5 El CAR que contiene IL13(E13Y) dirige específicamente a las células T para direccionar las células de glioma que expresan el receptor $\alpha 2$ de IL13 (denominado aquí IL13R $\alpha 2$), células de carcinoma renal y células de cualquier tipo de cáncer que expresan IL13R $\alpha 2$ de manera independiente de MHC. Se generaron efectores de células T CD4⁺ antitumorales para ser redirigidos a reconocer células tumorales usando un CAR que contiene los dominios de señalización derivados de CD3- ζ , CD28 y 4-1BB. O bien el CAR IL13 ζ o IL13-CD28-41BB ζ se transfectaron en células T primarias humanas utilizando un vector plásmido no viral (pEK) y métodos de electroporación (Nucleofector Tecnología_ de Amaxa Biosystems_, Gaithersburg, MD). Las células T CD4⁺ que expresan bien sea CAR (IL13 ζ o IL13-CD28-41BB ζ) se compararon por su potencial para activar las rutas de señalización asociadas al efector, producen citoquinas, lisan las células objetivo y controlan el crecimiento tumoral *in vivo*. Los resultados mostraron que la adición de los dominios de señalización de CD28 y 4-1BB a IL13 ζ potencia las funciones efectoras antitumorales de células T CD4⁺ que expresan el CAR. Las células T efectoras que expresan el inmunoceptor IL13-CD28-41BB ζ fueron capaces de mediar señales coestimuladoras a través de las JNK, p38 y Akt quinasas en el ambiente tumoral donde se esperaría que la coestimulación sea limitante. La coestimulación forzada en las células T CD4⁺ primarias humanas apoya la polarización de estas células con un fenotipo Th₁ de una manera que se asocia con una eficacia antitumoral sostenida tanto *in vitro* como *in vivo*. Se demostraron señales efectoras en dirección 3' del CAR en las células T CD4⁺. Estas señales efectoras se correlacionaron con el desplazamiento de Th₁ observado y la actividad efectora antitumoral prolongada de estas células tanto *in vitro* como *in vivo*.

20 La señalización de CD3 ζ sola guía la activación de ERK. Esto se correlaciona bien con el hallazgo aquí que la actividad de ERK no está potenciada en células que expresan IL13-CD28-41BB ζ en comparación con los controles que expresan IL13 ζ (ambos CAR contienen el dominio de señalización CD3 ζ). La coestimulación de CD3 con CD28 guía la activación de JNK y p38; la coestimulación de CD3 mediada por 4-1BB también involucra la activación de JNK. Tanto JNK como p38 desempeñan papeles principales en la conducción de la respuesta inmune polarizada de Th₁ por las células T CD4⁺, incluyendo su producción de IL2, IFN- γ y TNF- α . La activación de AKT quinasa, otro componente de señalización en dirección 3' tanto de CD28 como 4-1 BB, también está involucrada en la sobreexpresión de IL2 e INF- γ , pero no de citoquinas Th₂. La asociación de un fenotipo Th₁ pronunciado (véanse ejemplos, más adelante) con inducción de JNK y p38 MAP quinasa potenciada y activación sostenida de ATK (véanse ejemplos, más adelante) en células T que expresan IL13-CD28-41BB ζ indica fuertemente que las unidades estructurales de señalización de CD28 y 4-1BB trabajan con el dominio de señalización de CD3 en este receptor quimérico para retener la capacidad para transducir las rutas de señalización en dirección 3' que normalmente se asocian con estos receptores coestimuladores. Independientemente de lo fuerte que pueda ser el fenotipo de Th₁ activado direccionado por señales de dominio coestimuladoras, la retención y el reciclaje de las células T CD4⁺ efectoras antitumorales funcionales dentro del microambiente tumoral ayuda mucho en el logro de la potencia antitumoral.

40 En comparación con la activación sola mediada por CD3 ζ , las células T efectoras de CD4⁺ que expresan el CAR IL13-CD28-41BB ζ exhibieron actividad de MAPK y AKT aumentada/sostenida, producción de citoquinas Th₁ sobreexpresada, y potencia citolítica potenciada contra objetivos tumorales. Por otra parte, tras la estimulación recursiva con el tumor, las células CD4⁺ IL13-CD28-41BB ζ retuvieron/reciclaron su función lítica mientras que las células CD4⁺ IL13 ζ fueron efectivas, pero pronto se convirtieron en anérgicas/agotadas. Estas observaciones *in vitro* se correlacionaron con control *in vivo* potenciado de xenoinjertos de glioma del SNC ortópticos establecidos en ratones inmunodeficientes mediados por células T CD4⁺ expandidas ex vivo transferidas de forma adoptiva que expresan el CAR coestimulador. Estos estudios demuestran por lo tanto el efecto de integrar la coestimulación con eventos de señalización de CD3 ζ para activar completamente las células efectoras antitumorales CD4⁺ para la función sostenida en el microambiente tumoral.

50 Las señales coestimuladoras de CD28 y 4-1BB mediadas a través de AKT pueden inhibir la muerte celular inducida por activación a través de la sobreexpresión de las proteínas antiapoptóticas. La activación de AKT potenciada vista en las células T que expresan IL13-CD28-41BB ζ se asoció con reciclaje potenciado de la actividad específica de tumor *in vitro*, así como el control del crecimiento tumoral *in vivo* prolongado. Así, el CAR coestimulador puede mejorar la duración y/o retención de la actividad antitumoral de una manera que puede mejorar significativamente la eficacia clínica de los protocolos de terapia adoptivos.

55 Los CAR específicos de tumores que contienen sus propios dominios coestimuladores de señalización proveen una nueva metodología para la activación de los linfocitos T contra una variedad más amplia de tumores sólidos que no expresan estos ligandos coestimuladores. IL13R $\alpha 2$, por ejemplo, ha sido identificado como un objetivo de superficie celular sobreexpresado en diversos tumores humanos, incluyendo cáncer de seno, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, cáncer de ovario y el sarcoma de Kaposi, así como gliomas. Así, las células T que expresan un CAR que contiene un zetaquina IL13 y CD28 y el 4-1BB se pueden utilizar para el tratamiento de glioblastomas (glioma) y cualquier cáncer, tal como los mencionados anteriormente, que tienen el objetivo de IL 13 en su superficie.

Los CAR que contienen CD3 ζ , CD28 y 4-1 BB (y/u otros dominios de señalización coestimuladora) pueden ser dirigidos a cualquier tumor mediante la incorporación de una unidad estructural que se enlaza a un objetivo tumoral expresado en la superficie celular, por ejemplo un antígeno. Ejemplos de otros enlazantes objetivo específicos de tumores incluyen Her2/Neu (ErbB-2), la integrina $\alpha 3$, CD20, CD 19, EGFRvIII, IL3R α (CD 123), LEA, CD44v6 o cualquier objetivo específico a un tumor, preferiblemente un tumor sólido que no expresa el dominio de señalización coestimuladora el cual está contenido en el CAR. Por lo tanto, constructos para direccionar los tumores humanos de esta manera pueden incluir aquellos con especificidades para Her2/neu (ErbB-2), la integrina $\alpha 3$, CD20, CD19, EGFRvIII, IL3R α (CD 123), LEA, CD44v6 o cualquier antígeno tumoral específico o de otro componente de superficie celular accesible al enlazamiento por un receptor de células T quimérico. Las personas de experiencia son conscientes de estos antígenos tumorales específicos y los receptores que pueden ser explotados para apuntar un tumor específico, y son conscientes de los tumores que pueden ser direccionados de esta manera.

Tanto las funciones efectoras de las células T CD4⁺ y CD8⁺ pueden ser disparadas a través de estos receptores, por lo tanto, estos dos tipos de células T se contemplan para uso con la invención. Las células T CD8⁺ que expresan los CAR IL13 de esta invención pueden ser utilizadas para lisar células objetivo y para producir IL2 en presencia de las células objetivo, entre las otras funciones de estas células. La expresión del CAR coestimulador apropiado en cualquiera o ambas células T CD4⁺ y CD8⁺ se podría utilizar para proveer la población más efectiva de células para inmunoterapia adoptiva, que consiste, por lo tanto, de cualquiera o ambas células T auxiliares y asesinas profesionales que exhiben viabilidad potenciada y/o a largo plazo y actividad antitumoral.

Los siguientes ejemplos son solamente para el propósito de ilustrar una realización de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Transfección y expresión de receptores quiméricos específicos de IL13R $\alpha 2$ en linfocitos T humanos primarios.

Para acoplar tanto el receptor de células T (TCR)- y cascadas de señalización similares a las coestimuladoras tras la interacción con el antígeno de tumor de glioma IL13R $\alpha 2$, elementos de señalización derivados de CD28 y el 4-1BB se integraron en un receptor de antígeno quimérico (CAR) de IL13-zetaquina (IL13 ζ). El CAR IL13 ζ preferido está compuesto de la muteína IL13(E13Y) extracelular, Fc de bisagra IgG₄ humana enlazado a CD3 ζ citoplásmico humano a través del dominio transmembrana de CD4 humano. Véase la Figura 1. La síntesis de novo de la secuencia de codificación de IL13(E13Y) se realizó utilizando cebadores IL13P1, IL13P2, IL13P3, IL13P4 e IL13P5. Véase la Tabla I, más adelante, y la Figura 2. La secuencia final (417bp) fue digerida en el extremo con EcoRI-BamHI, y se ligó en el plásmido pSK (Stratagene™) como ligadura 312# 3. La ligadura 312#3 se mutagenizó (kit de Stratagene™, según las instrucciones del fabricante) para reparar un nucleótido eliminado utilizando los cebadores IL13 #312 3 mut5-3 e IL13 312# 3 mut3-5 y la ligadura 312#3 como plantilla, para formar la ligadura 348#1 (IL13 ζ /pSK).

La secuencia de codificación del péptido de señalización de cadena (hsp) alfa GM-CSFR humana se fusionó al extremo 5' de IL13(E13Y) por extensión de solapamiento de empalme por PCR estándar. La secuencia de hsp se obtuvo de la ligadura de plantilla 301#10 (hsp/PSK) utilizando los cebadores 5':19hsp5' y 3': hsp-IL13FR. Véase la Tabla I. La secuencia de IL13 se obtuvo utilizando los cebadores 5': hsp- IL13FF y 3':IL13-IgG₄FR, y la ligadura 312#3 como plantilla. Véase la Tabla I.

Una secuencia que codifica el Fc de IgG₄, la transmembrana CD4 y las regiones citoplásmicas CD3 ζ (IgG₄m: zeta; nucleótidos 421-1512 de la secuencia completa de IL13 ζ de la Figura 3 (SEQ ID NO: 12)) se fusionó al extremo 3' de la secuencia de fusión de IL13 al péptido de señal humana usando los mismos métodos. La secuencia IgG₄m: zeta se obtuvo utilizando los cebadores 5': IL13-IgG₄FF y 3': ZetaN3' (véase la Tabla 1), utilizando la secuencia R9.10 (IgG₄mZeta/PSK) como plantilla. La secuencia 1119 pb IgG₄m:zeta se fusionó a la secuencia de fusión hsp-IL13 utilizando las respectivas secuencias como plantillas, y los cebadores 5': 19hsp5' y 3': ZetaN3' (véase la Tabla 1), para producir una secuencia de fusión de 1522 bp hsp-1L13-IgG₄m:zeta. Los extremos digirieron con XbaI-NotI, y se ligaron en pSK como ligadura 351#7, para crear el plásmido IL13 ζ /pSK (4464 pb) (esto es, la secuencia IL13 ζ de la Figura 3, dentro del vector de clonación pSK).

Un vector de expresión que contiene la secuencia de codificación de IL13 ζ fue creado mediante la digestión de IL13 ζ /PSK con XbaI/NotI, y la creación de extremos romos con Klenow, y ligando el fragmento resultante en el plásmido pMG⁺Pac (Invitrogen_) (primero preparado por abertura con SgrAI, mitigando con Klenow y desfosforilación con SAP), para producir el plásmido IL13 ζ /pMG. La región de resistencia a la higromicina de IL13 ζ /pMG se eliminó por digestión con NotI-NheI, y se sustituyó por la fusión de selección/suicidio de HyTK, obtenido a partir del plásmido CE7R/HyTK-pMG por digestión con NotI-NheI, para crear el vector de expresión IL13 ζ /HyTK-pMG (6785 pb). Este plásmido comprende el promotor 1 α del factor de elongación humano (hEF1p) en las bases 6-549, la secuencia de codificación de IL13 ζ en las bases 690-2183, la señal de poliadenilación tardía del Virus de Simio 40 (SV40pAN tardío) en las bases 2230-2498, un origen de E. coli mínimo de replicación (Ori ColEI) en las bases 2499-3245, un sitio poli sintético A y de Pausa (SpAN) en las bases 3246-3432, el potenciador/promotor de CMV temprano inmediato (h CMV-1Aprom) en las bases 3453-4075, la fusión de la región

que codifica la timidina quinasa con resistencia a la higromicina (HyTK) en las bases 4244-6319, y la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina y una pausa de la transcripción (BGh pAn) en las bases 6320-6618. El plásmido tiene un sitio de linealización de Pacl en las bases 3233-3240. Todos los elementos hEF1p, SV40pAN tardío, OriColE1, SpAn, y hCMV-1Apron se derivaron del plásmido original pMG^ΔPac. En suma, IL13ζ/HyTK-pMG es un esqueleto de pMG modificado, que expresa el gen IL13ζ a partir del promotor HEF1, y la fusión de HyTK a partir del promotor de hCMV-1A. Un mapa del plásmido IL13ζ/HyTK-pMG aparece en la Figura 4. La secuencia completa del ácido nucleico del plásmido se muestra en las Figuras 5A-5L (SEQ ID NOS: 13 y 14. La secuencia del inserto IL13ζ también se da en la Figura 3 (SEQ ID NOS: 5 y 6).

El establecimiento de la integridad del constructo expresado fue confirmada por inmunotransferencia Western utilizando el clon 8D3 de anticuerpo monoclonal CD3ζ anti-humano (BD PharMingen™, San Diego, CA) para sondear lisados de células enteras derivados de células T Jurkat transfectantes estables cocultivadas en presencia o ausencia de tunicamicina, un inhibidor de la glicosilación. Los transfectantes estables de células T Jurkat (línea en volumen de Jurkat-IL13-pMG) se obtuvieron por electroporación de las células T Jurkat con el vector de expresión IL13ζ/HyTKpMG, seguidas por la selección y expansión de transfectantes positivos. Se sembraron por pozo 2x10⁶ células de la línea en volumen de Jurkat-IL13-pMG en una placa de 24 pozos con o sin 5 μg/ml, 10 μg/ml, o 20 μg/mL de tunicamicina. La placa se incubó a 37°C durante 22 horas. Las células fueron recolectadas de cada pozo, y cada muestra se lavó con PBS y se resuspendieron en 50 μL de regulador RIPA (PBS, NP40 al 1%, desoxicolato de sodio al 0.5%, SDS al 0.1%) que contiene inhibidor de la proteasa (1 tableta/10 ml de cóctel completo de inhibidor de proteasa). Las muestras se incubaron en hielo durante una hora, antes de ser centrifugadas a 4°C durante 20 minutos a 14,000 rpm. Las muestras de sobrenadante de lisado centrifugado se recolectaron y se hirvieron en una relación 1:3 en volumen de regulador de muestra bajo condiciones reductoras, luego se sometieron a electroforesis en SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 12%. Después de la transferencia a nitrocelulosa, la membrana fue entonces bloqueada en una solución de Blotto™ que contenía leche en polvo sin grasa al 4% en T-TBS (0,1% de Tween 20_ en solución salina regulada con Tris pH 8.0) durante 1 hora. La membrana fue entonces incubada con el anticuerpo monoclonal CD3ζ antihumano de ratón primario a una concentración de 0.5 μg/ml durante una hora, se lavó y luego se incubó con una dilución 1:3000 (en solución Blotto™) de anticuerpo secundario conjugado de fosfatasa alcalina de IgG anti-ratón de cabra (Kit de Bio-Rad™ ImmunoStar™) durante 1 hora. Antes del desarrollo, la membrana se lavó 4 veces adicionales en T-TBS, y luego se incubó con 3 mL de solución de sustrato de fosfatasa (Kit de Bio-Rad™ ImmunoStar™) durante 5 minutos a temperatura ambiente. La membrana se cubrió entonces con una cubierta de desarrollo de plástico (Tropix™) y se expuso a película de Rayos X. Consistente con el patrón de glicosilación conocido de IL13 humano de tipo silvestre, la movilidad electroforética de la IL13 (E13Y)zetakina expresada indica una proteína fuertemente glicosilada que, cuando se expresa en la presencia de tunicamicina, se reduce a un esqueleto de aminoácidos de aproximadamente 54 kDa.

La construcción del CAR coestimulador se inició con un constructo de HyTK-2A-IL13ζ-pcDNA3.1(+), que codifica el gen HyTK de fusión de selección/suicidio, el péptido 2A de la enfermedad de glosopeda autoescindible sintetizado de novo (TCTAGAGGAGCATGCCAGCTGTTGAATTTTGACCTTCTTAAGCTTGCGGGAGACGTC GAGTCCAACCCTGGGCC; SEQ ID NO: 49), y la molécula IL13ζ, (Figura 3), se clonó en pcDNA3.1(+) (Invitrogen™). Para conferir resistencia al metotrexato (MTX), el gen HyTK fue reemplazado por PCR con un gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (amplificado a partir de una librería de ADNc derivada de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que habían sido estimulados durante tres días con el anticuerpo OKT3 el cual reconoce la cadena CD3 del receptor de células T que contenía mutaciones de L22F y F33S generadas usando un Kit de Mutagénesis Dirigida al Sitio QuikChange™ (Stratagene™). El constructo DHFRdm-2A-IL13ζ resultante fue entonces escindido con NheI y NotI, se eluyó y se ligó en el vector pEK de expresión de plásmido de mamífero digerido de manera similar. El vector PEK había sido modificado originalmente de pcDNA3.1(+) mediante la eliminación del promotor de CMV y el gen de ampicilina y reemplazándolo con el gen promotor 1α del Factor de Elongación humana (EF1p) derivado de pMG (Invivogen™) para crear el plásmido DHFRdm-2A-IL13ζ_pEK (pJ01275-9). El ADNc de CD28 fue adquirido de Invitrogen™ y la región de codificación de 4-1BB se amplificó por PCR a partir de una librería de ADNc derivada de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que habían sido estimuladas durante tres días con el anticuerpo OKT3 (utilizando cebadores 41BB5' y 41 BB3', véase la Tabla 1).

Las regiones de señalización intracelular de CD28 y 4-1BB (aminoácidos 180-220 y 214-255, respectivamente, de las secuencias de CD28 y 4-1BB nativas) se fusionaron mediante PCR (usando los cebadores CD4-CD28F, CD28-4-1 -BBR, CD28-4-1bbF, y 41bb93 provistos en la Tabla 1) en la unión entre la transmembrana CD4 y CD3ζ citoplasmático (aminoácidos 52-164 de las regiones CD3ζ nativas. Véase la Figura 6, que provee representaciones esquemáticas de ejemplos de IL13ζ (Figura 6A) y constructos de plásmidos lineales de IL13-CD28-41BBζ (Figura 6B). La colocación de muteína IL13 humana (E13Y), Fc de bisagra de IgG₄ humana (IgG₄), transmembrana CD4 humana (tm), segmentos citoplásmicos de CD3ζ humano (Zeta), citoplásmicos de CD28 (28c) y citoplasmáticos de 4-1 BB (BBC) se indican en la Figura 6. Los sitios de enzimas de restricción que se usaron para insertar los diferentes fragmentos de PCR también se indican en la Figura 6 (NheI, KpnI, NsiI, NotI), con sus locaciones de pares de bases predichas provistas en paréntesis. Como se muestra en la Figura 6A, el CAR, IL13-CD28-41BBζ, comprende el dominio citoplásmico de CD28 y el 4-1BB fusionado al de CD3ζ. Cada constructo que se muestra en la Figura 6A tiene un dominio huIL13 que contiene la mutación E13Y que lo hace específico a IL13Rα2, un dominio Fc de bisagra de IgG₄ humano (hγ4Fc), un dominio de transmembrana CD4 humana (huCD4tm) y un dominio

citoplasmático de CD3 humano (huCD3ζ cyt); el CAR IL13-CD28-41BBζ tiene los dominios de señalización (sig) de CD28 y el 4-1BB insertados entre los dominios de la transmembrana CD4 y citoplásmicos de CD3. Los cebadores de PCR utilizados en la construcción de los plásmidos y utilizados en el análisis de expresión se proveen en la Tabla I.

5 Cultivos en volumen de células T CD4⁺ obtenidos por separación MACS[™] usando el protocolo del fabricante (Miltenyi Biotec[™] Inc.) se mantuvieron en medios RPMI con FCS al 10%, L-glutamina al 1%, regulador HEPES al 2.5%, 50 U/mL rhIL2, 10 ng/mL rhIL15 y 0.1 μM MTX. El aislamiento, la activación y la electroporación de células T humanas se realizó como sigue. Las PBMC se aislaron por centrifugación en gradiente de densidad sobre Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech[™]) de sangre periférica heparinizada obtenida a partir de consentimiento de donantes sanos. Las células se resuspendieron en solución de nucleofección utilizando el kit Nucleofector de células T humanas de Amaxa[™] (Amaxa[™] Inc.). Se agregó plásmido (1 μg/5x10⁶ células), y las células se sometieron a electroporación usando el Nucleofector I de Amaxa[™] (Amaxa[™] Inc.), programa U-14. Las células fueron entonces recolectadas en medio libre de rojo de fenol con FCS al 10%, dejándolas en reposo durante la noche, y luego se estimularon con 30 ng/ml de OKT3 y 5 ng/mL de rhIL15 en RPMI con FCS al 10% durante tres días. Los transfectantes exitosos fueron seleccionados utilizando un medio que contenía MTX 0.1 μM y 5 ng/ml de rhIL15.

La expresión de los CAR se determinó mediante análisis de inmunotransferencia con un anticuerpo específico para CD3ζ. Lisados de células enteras de células T CD4⁺ seleccionados de MTX en volumen (transfectadas de forma simulada, IL13ζ- e IL13-CD28-41-BBζ) se probaron para la expresión del CAR (CD3ζ quimérico) usando métodos conocidos y un anticuerpo monoclonal específico de CD3ζ antihumano de ratón disponible comercialmente, 1D3. Como era de esperarse con tales proteínas altamente glicosiladas, se observaron múltiples bandas dentro de los pesos moleculares esperados. Véase la Figura 7.

Los niveles de CAR IL13ζ o IL13-CD28-41BBζ expresados en la superficie de las células T CD4⁺ se examinaron mediante la detección de IL13 enlazada a la membrana usando citometría de flujo. Véase la Figura 8. Las PBMC transfectadas con ADNc que codifican CAR IL13ζ o IL13-CD28-41BBζ se propagaron durante un promedio de 10 semanas bajo concentraciones selectivas de MTX (0.1 μM), magnéticamente ordenadas para células CD4⁺ por separación MACS[™], y se examinaron para la expresión de superficie del CAR que contiene IL13 (Eje Y), y CD4, CD8, TCRα/β, o CD28 (eje X) como se indica. Se utilizaron MAb fluorescentes coincidentes con isotipos para establecer los cuadrantes. Estas poblaciones de células T genéticamente modificadas no fueron solamente predominantemente CD4⁺ y CD8, como se esperaba después de la purificación por MACS[™] basada en perlas magnéticas de células CD4⁺, sino que también expresaron niveles altos y equivalentes de TCR endógeno y bajos hasta a niveles indetectables de coestimuladores CD28. Véase la Figura 8.

La línea objetivo de células de tumores de glioblastoma humana IL13Rα2⁺ utilizada en estos estudios, U87, también fue fenotipificada para confirmar que esas células expresan MHC de clase I y clase II en su superficie y no expresan ligandos estimuladores CD80/86 o 4-1BBL. Véase la Figura 9, que muestra la tinción de la superficie de moléculas MHC HLA-A2 y HLA-DR, IL13R y moléculas coestimuladoras CD80, CD86, y CD137-L (4-1BBL) (histogramas rellenos), como se indica, en comparación con controles de isotipo (histogramas abiertos) en las células objetivo de glioma U87, como se analizó por citometría de flujo.

El análisis de citometría de flujo involucrado que evalúa la expresión de la superficie celular de los constructos de CAR de IL13 por tinción con anticuerpos monoclonales IL3 antihumanos conjugados con FITC o conjugados con PE (BD PharMingen[™]). El fenotipo de la superficie celular de células T humanas primaria transfectantes se ensayó con anticuerpos α/β anti-CD4, anti-CD8, y anti-TCR conjugados con FITC o con anticuerpos anti-CD28 conjugados con PE (BD PharMingen[™]). El fenotipo de la superficie celular de células de glioma humano U87 se ensayó con anticuerpos anti-HLA-A2, anti-HLA-DR, y anti-CD80 conjugados con FITC, o con anticuerpos anti-CD86 y anti-CD137-L (4-1BBL) conjugados con PE, en comparación con controles de isotipo conjugados con FITC y PE (BD PharMingen[™]). La expresión IL13Rα2 se ensayó usando IL13Rα2 antihumano de cabra (R & D Systems[™]) seguido de IgG anti-cabra de ratón conjugado con FITC (Jackson ImmunoResearch[™]).

Tabla I. cebadores de PCR para construcción de CAR.

Nombre del cebador	Secuencia del Cebador (5'-3')	SEQ ID NO:
IL3P1	TATGAATTCATGGCGCTTTTGTGACCACGGTCATTGCTCTCACTTGCC TTGGCGGCTTTGCCTCCCCAGGCCCTGTGCCTCCCTCTACAGCCCTCAG	17

IL3P2	GTTGATGCTCCATAACCATGCTGCCATTGCAGAGCGGAGCCTTCTGGTT CTGGGTGATGTTGACCAGCTCCTCAATGAGGTACCTGAGGGCTGTAGA	18
IL3P3	CTCTGGGTCTTCTCGATGGCACTGCAGCCTGACACGTTGATCAGGGAT TCCAGGGCTGCACAGTACATGCCAGCTGTCAGGTTGATGCTCCATACC	19
IL3P4	CCTCGATTTTGGTGTCTCGGACATGCAAGCTGGAAACTGCCAGCTG AGACCTTGTGCGGGCAGAATCCGCTCAGCATCCTCTGGGTCTTCTCGA	20
IL3P5	TCGGATCCTCAGTTGAACCGTCCCTCGCGAAAAAGTTTCTTTAAATGT	21
IL13 312#3	CAACCTGACAGCTGGCATGTACTGTGCAGCCCTGGAATC	22
mut5-3		
IL13 312#3	GTTGGACTGTCGACCGTACATGACACGTGCGGACCTTAG	23
mut3-5		
5':19hsp5'	ATCTCTAGAGCCGCCACCATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTC	24
3': hsp-IL13FR	GAGGGAGGCACAGGGCCTGGGATCAGGAGGAATG	25
5': hsp-IL13FF	CATTCTCCTGATCCCAGGCCCTGTGCCTCCCTC	26
3': IL13-IgG ₄ FR	GGGACCATATTTGGACTCGTTGAACCGTCCCTCGC	27
5': IL13-IgG ₄ FF	GCGAGGGACGGTTCAACGAGTCCAAATATGGTCCC	28
3': ZetaN3'	ATGCGGCCGCTCAGCGAGGGGGCAGG	29
41BB5'	ATCGAATTGCGCCGCCACCATGGGAAACAGCTGTTACAAC	30
41BB3'	GATAAGCTTATCGATTACACATCCTCCTTCAGTT	31
CD4-CD28F	CATTGGGCTAGGCATCTTCTTCAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTC	32
CD28-4-1BBR	GTTTCTTTCTGCCCGTTTGCCACCTCCGGAGCGATAGGCTGCGAAG	33
CD28-4-1BBF	CTTCGCAGCCTATCGCTCCGGAGGTGGCAAACGGGGCAGAAAGAAAC	34
4-1BB93'	GTTGCGGCCGCTCACAGTTCACATCCTCCTTCTTCTTC	35

Ejemplo 2. Potenciación de la señalización las MAPK de JNK y p38 con señalización AKT sostenida por IL13-CD28-41BBζ.

5 Las células T estimuladas por el acoplamiento del complejo TCR-CD3 junto con los receptores auxiliares CD28 o el 4-1BB son conocidos por conducir señales a través de AKT, así como las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs). Para investigar la capacidad de los CAR coestimuladores para influir estas rutas efectoras en dirección 3', se utilizaron ensayos de quinasa *in vitro* para evaluar y comparar la actividad de los miembros de la familia AKT y MAPK ERK, JNK y p38 en células T CD4⁺ que expresan IL13ζ- e IL13-CD28-41BBζ después del acoplamiento de las células objetivo U87. La línea de glioma humano, U87, se obtuvo de ATCC (Rockville, MD). 10 Todas las líneas tumorales son adherente, y se cultivaron en DMEM (Irvine Scientific™) suplementado con FCS al 10% inactivado por calor, HEPES 25 mM, y L-glutamina 2 mM. Las células T CD4⁺ que expresan CAR IL13ζ o IL13-CD28-41BBζ se incubaron con células de glioma U87 durante los tiempos indicados en la Figura 10 antes del ensayo.

15 Después de que las células T CD4⁺ que expresan IL13ζ- o IL13-CD28-41BBζ se estimularon con células objetivo tumorales durante hasta 48 horas (Figura 10A) o 72 horas (Figura 10B), los niveles de los sustratos de proteína total de JNK, p38 y Akt (esto es, cJun, ATF2, y GSK3, respectivamente) y los sustratos fosforilados (P-cJun, P-ATF2, y P-GSK3, respectivamente) se midieron mediante inmunotransferencia Western. El aumento de veces en la fosforilación de cada sustrato, como una medida de la actividad de quinasa, se indica en la parte inferior de cada grupo en la Figura 10.

Se realizó un ensayo de quinasa en estado sólido no radiactivo usando un método modificado de Hibi et al., "Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain." *Genes Dev.* 7:2135-2148,1993. Usando lisados de células T que habían sido separados de células objetivo por centrifugación suave (1000 rpm, <3 minutos), la quinasa seleccionada se inmunoprecipitó durante la noche a 4°C utilizando anticuerpos específicos para ERK1/2, JNK, p38, y AKT (Cell Signaling Technology Inc.™). Los complejos inmunoprecipitados se lavaron en regulador de lisis (PBS con NP40 al 1%, SDS al 0.1%, y desoxicolato de sodio al 0.5%) y regulador de quinasa (Tris 25 mM, pH 7.5, que contenía MgCl₂ 10 mM y EGTA2 mM), y el ensayo se realizó a 30°C durante 30 minutos, usando 1 µg de sustrato en presencia de ATP 10 µM.

Las proteínas de fusión de glutatona S-transferasa (GST): GST-ELK, GST-ATF2 y GST-GSK3 (Cell Signaling Technology™ Inc.), y GST-cJun(1-79) (como se describe en Chang et al., *Cell* 124:601-613, 2006) se utilizaron como los sustratos para los ensayos de ERK, p38, AKT, y JNK quinasa, respectivamente. Los productos resultantes se resolvieron en 12% de NuPAGE™ (Invitrogen™) de acuerdo con métodos estándar y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa utilizando el Xcell II Blot Module™ (Invitrogen™). Las transferencias se sondearon con anticuerpos para fosfo-ELK, ATF2, cJun y GSK3 (Cell Signaling Technology Inc™) para detectar proteínas y anticuerpos de fusión de GST fosforilados a GST (BD PharMingen™) para detectar la cantidad total de sustrato. Las inmunoprecipitaciones fueron entonces incubadas con anticuerpos específicos de inmunoglobulina de conejo conjugado con IRDye 680 de ratón conjugado con IRDye800 (LI-COR™). El regulador de bloqueo (adquirido de LI-COR™) se utilizó para pretratar transferencias y para la dilución de anticuerpos. Las transferencias fueron vistas y se registraron utilizando un Odyssey™ Infrared Imaging System (LICOR™) y las intensidades de la banda se cuantificaron utilizando el software v2.0 Odyssey™ (LI-COR™). La fosforilación de sustrato, una medida de la actividad de la quinasa, se cuantificó y se normalizó a las correspondientes cantidades detectadas de quinasa inmunoprecipitada y el sustrato total de quinasa. La actividad de la quinasa relativa de las células T CD4⁺ de IL13ζ⁺ en t = 0 se le dio un valor arbitrario de 1.0; los guiones (-) indican la multiplicidad de diferencias <1.0 (véase Figura 10).

El ensayo de quinasa fue capaz de detectar la actividad de JNK y p38 MAPK potenciada y la actividad prolongada de la AKT quinasa en las células T CD4⁺ de IL13-CD28-41BBζ después del cocultivo con células de glioma U87. Como se muestra en la Figura 10, la activación de JNK y p38 fue más fuerte en las células T CD4⁺ que expresan IL13-CD28-41BBζ que en aquellas que expresan IL13ζ. Véase la Figura 10. En contraste, la activación de otro MAPK, ERK, fue comparable entre los dos tipos de células. Se observó activación de AKT en ambas poblaciones de células T, pero se elevó solamente hasta las 24 horas en las células IL13ζ⁺ mientras que las células IL13-CD28-41BBζ⁺ desplegaron elevada actividad de AKT por hasta 72 horas o más. Véase la Figura 10B. Así, AMBOS CAR fueron efectivos, pero los dominios coestimuladores en el CAR IL13-CD28-41BBζ produjeron actividad de AKT más sostenida en comparación con la observada con el CAR IL13ζ.

Ejemplo 3. Polarización de Th₁ refuerza las señales de coestimulación de efectores de CD4⁺ redirigidos al tumor.

Debido a que la actividad de p38 ha sido detectada en Th₁ pero no en las células Th₂, y se sabe que la activación de JNK/p38 induce la producción de Th₁ de citoquinas TNF-α y IFN-γ asociadas, se investigó el efecto de la función coestimuladora de CD28 y el 4-1BB en la inducción mediada por el CAR de las citoquinas asociadas a Th₁. Las células T CD4⁺ modificadas genéticamente (106 células) que expresan IL13ζ o IL13-CD28-41BBζ se cocultivaron en placas de cultivo de tejidos de 24 pozos con diferentes células estimuladoras (5 x 10⁵ células) en 2 mL de medio de cultivo. Las células estimuladoras fueron células de glioma U87 (U87), las células de mieloma de ratón NS0 parentales (NS0), células NS0 que expresan establemente IL13Rα2 de superficie (NS0-IL13Rα2) o células NS0 que expresan establemente OKT3 unida a la membrana (NS0-OKT3) como se indica en la Figura 11A.

Se utilizó RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) para medir los niveles de ARNm relativos después del cultivo. Para el análisis de la expresión génica, se aisló el ARN celular total de los transfectantes de células T CD4⁺ utilizando un kit RNeasy™ (Qiagen™). La transcripción reversa de 5 µg de ARN total en un volumen de 30 µL (que contenía 1x regulador de transcriptasa reversa, oligo dT 2.5 mM, dNTP 0.25 mM, ditiotreitilo 0.01 M, 20 U de Rnasin y 200 U de transcriptasa reversa de SuperScript™ II RNase H (Invitrogen™)) se utilizaron para sintetizar ADNc. Las muestras se incubaron a 42°C durante 1 hora y la transcriptasa reversa fue entonces inactivada por calentamiento de 5 minutos a 70°C. Dando como resultado ADNc, equivalente a 0.2 µg de ARN total, se sometió a análisis por qPCR utilizando mezcla maestra de PCR de SYBR Green (Applied Biosystems™) y los cebadores diseñados por sistema de detección de PCR en tiempo real de DNA Engine Opticon 2™ (MJ Research Inc™). Las secuencias de cebadores de los genes probados IL2 e IFN-γ son los siguientes: IL2 de avance: CAAGAATCCCAAACTCACCAG, SEQ ID NO: 50; IL2 en reverso: CGTTGATATTGCTGATTAAGTCC, SEQ ID NO: 51; IFN-γ de avance: ATCCCAGTAATGGTTGCCTGCCT, SEQ ID NO: 52; IFN-γ en reverso: TCTTGCTTAGGTTGGCTGCCTAGT, SEQ ID NO: 53. El valor promedio del umbral del ciclo (CT) del ARNm de ciclofilina (como se describe en Chang et al., "The E3 ubiquitin ligase itch couples JAK activation to TNFalpha-induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover." *Cell* 124:601-613, 2006) se utilizó para normalizar los genes probados. Los valores promedio de CT se determinaron mediante mediciones de qPCR por triplicado para cada gen en cada condición experimental.

El ARNm total de células T se recogieron a las 0 horas (Figura 11A, barras blancas), a las 7 horas (Figura 11A, barras negras) y a las 24 horas (Figura 11A, barras sombreadas) para el análisis por qPCR de los ARNm humanos

indicados. * Indica un $p < 0.05$ en comparación con los valores de 7 horas de células T CD4⁺ que expresan IL13 ζ utilizando una prueba t de Student no apareada. La línea de mieloma de ratón NS0 se sometió a electroporación con bien sea IL13R α 2-IMPDPH2_pMG (pJ00659), lo que confiere la expresión del antígeno objetivo de IL13R α 2 y la resistencia al ácido micofenólico (MPA) o OKT3-IMPDPH2_pcDNA3.1(+)(pJ01056), lo que confiere la expresión de la molécula OKT3 de entrecruzamiento por CD3 (y así células T estimuladoras) junto con resistencia a MPA, y luego se clonó en la presencia de 6 μ M de ácido micofenólico (MPA) y se exploró para la expresión del transgen IL13R α 2 humano. Para los experimentos en que se utilizó U87 y células tumorales NS0-IL13R α 2, n = 3; para el experimento en que se utilizó células tumorales NS0-OKT3 y NS0, n = 1.

Los niveles de ARNm de IL-2 e INF- γ fueron mayores en las células T de IL13-CD28-41BB ζ que en las células T de IL13 ζ después del cultivo con células de glioblastoma U87. Véase la Figura 11A. No se observó inducción de ARNm de IL2 o INF- γ con cualquier población de células T cuando se cocultivaron con células NS0. La estimulación por células NS0 que expresan transgenes de IL13R α 2 restauró la inducción de ARNm de IL2 e INF- γ en las células T que expresan IL13-CD28-41BB ζ pero no en IL13 ζ , lo que indica que los genes de inducción de citoquinas eran dependientes de IL13R α 2. Las cantidades relativas de ARNm de IL2 e INF- γ inducido se correlacionan directamente con los niveles de expresión de superficie de IL13R α 2 en U87 y las células NS0 que expresan transgenes; el nivel U87 es más alto que el de las células NS0-IL13R α 2. En contraste, la inducción de los genes IL2 e INF- γ en las células T de IL13 ζ fue similar al que se vio en las células T de IL13-CD28-41BB ζ cuando cada población fue cocultivada con células NS0 que expresan de manera estable OKT3 enlazada a la membrana, una molécula de inmunoglobulina agonista que activa las células T a través del acoplamiento de CD3 ϵ . Estos resultados indican que la inducción inferior de ARNm de IL2 e INF- γ mediada por el acoplamiento de IL13 ζ con IL13R α 2 no se debe a un defecto intrínseco en estas células T, sino a la carencia de dominios coestimuladores de CD28 y el 4-1BB dentro del CAR.

Para cuantificar las cantidades de proteínas de citoquina de Th₁ versus Th₂ liberadas de las células T que expresan CAR, los sobrenadantes de estos cocultivos se ensayaron para el contenido de citoquinas. Después de una incubación de 24 horas, los sobrenadantes del cultivo de IL13 ζ ⁺ (barras blancas) o IL13-CD28-41BB ζ ⁺ (barras negras) se recolectaron y se ensayaron para citoquinas de Th₁ y Th₂ por arreglo de perlas citométricas múltiples utilizando el kit 17-Plex Panel™ humano según las instrucciones del fabricante (Bio-Rad Laboratories). Véase la Figura 11B.

Glioma U87 o células NS0 de IL13R α 2⁺ estimularon más liberación de citoquinas Th₁ (IL2, IFN- γ , TNF- α y GM-CSF) y menos liberación de citoquinas Th₂ (IL5, IL10 e IL13) de células T de CD28-41BB ζ que de células T de IL13 ζ . Los niveles equivalentes de citocinas Th₁ y Th₂ fueron producidos por células T CD4⁺ que expresan IL13 ζ - e IL13-CD28-41BB ζ cultivadas con células NS0 que expresan OKT3, lo que indica que estas células permanecen no polarizadas tras la activación policlonal a través de CD3 endógeno. Los niveles de citoquinas estaban todos bajos hasta indetectables cuando las células T fueron cultivadas con células NS0 parentales. Los niveles de la IL-4 de citoquina Th₂ también estaban bajos hasta indetectables cuando las células T fueron cultivadas con cualquiera de las líneas celulares tumorales. En general, estos datos muestran que la presencia de dominios coestimuladores de CD28 y 4-1BB dentro del CAR ayuda a controlar la transcripción y secreción de células T CD4⁺ de citoquinas similares a Th₁.

Ejemplo 4. Incremento en actividad lítica antitumoral de reciclaje en las células TCD4⁺ de IL13-CD28-41BB ζ .

Para determinar si el CAR coestimulador afectó a la actividad citotóxica específica tumoral de las células T CD4⁺, se realizaron ensayos citolíticos luminiscentes (LCA) para detectar la actividad de luminiscencia del transgen de luciferasa de luciérnaga (ffLuc) de las células tumorales *in vitro*. Este ensayo se realizó como se ha descrito por Brown et al., "Biophotonic cytotoxicity assay for high-throughput screening of cytolytic killing." J. Immunol. Meth. 297:39-52, 2005, con 0.14 mg/mL de D-luciferina y usando un luminómetro Victor2™. Brevemente, se analizó la actividad de luminiscencia del transgén de ffLuc de las células tumorales *in vitro* por LCA con 0.14 mg/ml de D-luciferina (Xenogen™) utilizando un luminómetro Victor2™. Véase la Figura 12A, que muestra actividad citotóxica potenciada de las células T CD4⁺ de IL13-CD28-41BB ζ ⁺ (■) contra objetivos U87 en comparación con las células T CD4⁺ de IL13 ζ ⁺ (○) en la relación E:T indicada después de 4 horas. La media \pm SE de valores por triplicado se indican; * Indica un $p < 0.05$ usando una prueba t de Student no apareada.

Después de 4 horas de cocultivo con células objetivo U87 transfectadas con ffLuc, las células de IL13-CD28-41BB ζ mostraron un potenciamiento estadísticamente significativo en la actividad lítica en comparación con las células de IL13 ζ . Si el cocultivo se extendió a 48 horas, no se observó ninguna diferencia en la actividad citotóxica entre las células que expresan IL13 ζ y IL13-CD28-41BB ζ (100% de lisis específica se alcanzó con ambas células). Los datos en la Figura 12B indican lisis específica mediante ensayo por LCA después de 48 horas de cocultivo en una relación E:T de 2:1, y luego otra vez después de la adición de objetivos frescos durante otras 48 horas de cocultivo a una relación E:T de 2:1. La media \pm SE de valores por triplicado se indican; * Indica un $p < 0.05$ (prueba t de Student apareada) comparando las células T CD4⁺ de IL13-CD28-41BB ζ (barras negras) con las células T CD4⁺ de IL13 ζ (barras blancas) en el cocultivo indicado.

Los niveles de ARNm de perforina y granzima B fueron igualmente sobrerregulados en las células de IL13 ζ y de IL13-CD28-41BB ζ , lo que sugiere que estas células T que expresan CAR pueden utilizar mecanismos similares de

asesinato. Sin embargo, si se agregaron objetivos de fLuc frescos para una segunda ronda de 48 horas de cocultivo con las mismas células CD4 T que expresan CAR las células de IL13 CD28-41BBζ despliegan significativamente mayor actividad lítica que las células de IL13ζ (Figura 12B). Esto sugiere que el CAR coestimulador afecta beneficiosamente la duración y/o reciclaje de la actividad mortal de células T CD4.

5 Para examinar adicionalmente este fenómeno, se analizó la viabilidad de las células tumorales U87 durante el cocultivo con células T de IL13ζ o de IL13 CD28-41BBζ utilizando microscopía con lapso de tiempo en vídeo (VTLM) de cocultivos de 6×10^5 células de glioma U87 adherentes con células T CD4⁺ que expresan 1.2x10⁶IL13ζ- o IL13-CD28-41BBζ. Los cultivos se lavaron 45 horas después y luego se recultivaron con células de glioma U87 frescas (6×10^5). El número de células tumorales viables se representaron sobre 42 horas (la primera matanza) y de 45 horas a 139 horas (la segunda matanza). Véase la Figura 12C.

15 La formación de imágenes se llevó a cabo simultáneamente en un cuarto caliente a 37°C en cuatro microscopios Eclipse TS100™ (Nikon™ Inc.), cada uno equipada con una lámpara de tungsteno-halógeno, filtro GIF (verde), condensador de NA ELWD 0.3, Plan Fluor™ 4x/0.13 PhL DL lente objetivo corregido a infinito, adaptador de montura C sin lente D10NLC 1x (Diagnostic Instruments™) y cámara CCD 1/2" de vídeo VCB 3524 B/W RS-170 (Sanyo™ Norte America Corp.). Para recolectar los datos, se agregaron 1.2×10^6 células T (en 200 μL de solución salina equilibrada de Hank suplementada con 0.1% de albúmina de suero humano) a matraces T-25 que contenían 6×10^5 células U87 adherentes (sembradas 1 día antes en 3×10^5 células/matraz). Los matraces fueron mantenidos equilibrados en la platina del microscopio durante 30 minutos antes de la formación de imágenes. La rata de adquisición de lapso de tiempo estaba en intervalos de 2 minutos. Varios marcos de células tumorales solos fueron adquiridos en cada vídeo, seguido de la adición de las células T. Las células combinadas fueron entonces registradas de forma continua durante 80 horas. Después de la adición de las células T, cada matraz fue gaseado con 5% de CO₂ durante 10 segundos y sellado sella con parafilm para asegurar el buen control de pH (bicarbonato en HBSS) y el enfoque estable, respectivamente. Las imágenes fueron adquiridas mediante el Organizador de Cámara COH VTLF y digitalizadas a 640x480 píxeles con una tarjeta de agarre de cuadros de 4 canales Matrox™. El recuento de células tumorales viables se realizó a intervalos de ≤ 10 horas utilizando el comando "Contar manualmente objetos" en MetaMorph™ 6.33 (Universal Imaging/Molecular Devices™ Corp.). Todos los conjuntos de datos se importaron en MetaMorph™ y se guardaron como pilas Meta-Morph™ y películas en formato AVI.

20 La capacidad de cualquiera de las células T CD4⁺ modificadas genéticamente para matar las células tumorales durante las primeras 42 horas de cocultivo fue sustancialmente la misma (casi 100% de las células U87 murieron en 30 horas). Sin embargo, en el segundo encuentro con células tumorales U87, las células T de IL13-CD28-41BBζ recuperadas conservaron una mayor actividad citolítica que las células T de IL13ζ. Es importante destacar que la enumeración de las células T antes de la adición de las células U87 para un segundo tiempo reveló que no hubo diferencias significativas en el número de células. Adicionalmente, los ensayos basados en CFSE realizados durante 72 horas de cocultivo con células U87 no revelaron diferencias en la proliferación de células T de IL13ζ o de IL13-CD28-41BBζ *in vitro*. Esto demuestra que la mayor actividad citolítica tras la adición de objetivos frescos no se debió a la presencia de más asesinos, pero si a una capacidad potenciada de los asesinos individuales para funcionar. En conjunto, estos datos muestran que el CAR coestimulador apoya el reciclaje y la retención de la función de células T CD4.

Ejemplo 5. Eliminación potenciada de tumores *in vivo* mediante células T CD4⁺ de IL13-CD28-41BBζ.

40 La capacidad de los CAR con dominios de señalización de CD28 y 4-1BB para potenciar la eficacia antitumoral de las células T CD4⁺ se estableció usando tumores U87 establecidos en un modelo de xenoinjerto murino ortotópico. Para los estudios *in vivo*, las células U87 se transfectaron con fLuc-zeocin_cDNA3.1(+) (pJ00778, un plásmido que expresa una fusión de proteína de la enzima luciferasa de luciérnaga y el gen de resistencia a los fármacos zeocina) e IL2 (2) _HyTk-pMG (pJ00976 , un plásmido que expresa la citoquina IL2 y el gen de fusión de selección/suicidio HyTK) usando oligofectimina (Invitrogen™) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y luego se clonaron en presencia de 0.2 mg/ml de zeocina y 0.1 mg/ml de higromicina.

50 Para producir el modelo de xenoinjerto de glioma ortotópico, los ratones fueron tratados como sigue. Un día después de la irradiación con 250 rads, se anestesiaron ratones macho NOD-Scid de 6 a 8 semanas de edad, se afeitaron y se inmovilizaron con restricción con aparato estereotáctico adaptador para ratón/rata neonatal Cunningham™ (Stoelting™). Los ratones recibieron entonces una inyección guiada estereotácticamente de tumor (glioma U87) 2 mm lateral y 0.5 mm anterior al bregma a lo largo de 3-5 mm. Las células tumorales U87-ffLucZeo/IL2⁺ (2×10^5 células/ratón), se suspendieron en 2 μL de RPMI libre de fenol (Irvine Scientific, Irvine, CA), se inyectaron a una profundidad de 2.5 mm desde la duramadre. Siete días después de la inoculación del tumor, 10⁶ células T que expresan bien sea IL13ζ IL13-CD28-41BBζ fueron suministradas (transferidas de forma adoptiva) en 2 μL al tumor coordinadas en el cerebro. Los animales de control recibieron solamente PBS ("control simulado"). Los agujeros Burr fueron sellados con cera para hueso y la incisión cerradas con pegamento Nexaband™. Los animales recibieron una inyección subcutánea de 0.1 mg/kg de Buprenex™ para la recuperación postquirúrgica. En este modelo, los tumores comienzan a desaparecer espontáneamente en 13-14 días después de la inyección debido a la recuperación del sistema inmune endógeno, así que los experimentos fueron completados por el día 12.

El crecimiento del tumor ortotópico se puede cuantificar de forma no invasiva mediante la monitorización de señales de flujo de ffLuc derivadas de tumores en células de glioblastoma U87 establecidos que expresan de forma estable la luciferasa de luciérnaga (ffLuc) e IL2 humana. La actividad de luciferasa *in vivo* se detectó utilizando formación de imágenes de tumores biofotónicos *in vivo* en ratones con el Sistema de Formación de Imágenes *In vivo* de Xenogen™ (IVIS) como se describió previamente por Kahlon et al., "Specific recognition and killing of glioblastoma multiforme by interleukin 13- zetakine redirected cytolytic T cells." *Cancer Res.* 64:9160-9166,2004. Brevemente, para monitorizar el flujo de ffLuc, los ratones fueron inyectados por vía intraperitoneal con 4.29 mg de D-luciferina, anestesiados (1.5 L/min de oxígeno + 4% de isoflurano), y la emisión de luz se midió durante un tiempo de integración de 1 minuto a 14 minutos después de la inyección de luciferina. El flujo (fotones/segundo) se cuantificó como conteos totales medidos con el tiempo en la región de interés. Véanse los resultados en la Figura 13. Los valores del eje Y representan la media \pm SD de los niveles de flujo totales de los tumores ffLuc⁺ de control y los grupos tratados (n = 6 para cada grupo) en los días indicados después del injerto del tumor. "Tx" indica tratamiento con células T transferidas de forma adoptiva.

Antes de la transferencia adoptiva de células T CD4⁺ que expresan CAR, todos los ratones presentaban niveles incrementados de las señales de flujo de ffLuc derivadas del tumor como se esperaba (véase la Figura 13; se comparan los días 2 y 6 después del injerto del tumor). Dos días después de la transferencia adoptiva (Tx), los niveles de flujo de ffLuc tumoral se redujeron en los ratones tratados ya sea con células T que expresan IL13 ζ o IL13-CD28-41BB ζ , en comparación con los ratones recibieron tratamiento simulado. Sin embargo, 5 días después del tratamiento con células T (día 12 después del injerto), las señales de flujo de tumores en los ratones tratados con células T de IL13-CD28-41BB ζ se mantuvieron bajas, mientras que las señales de flujo de los ratones tratados con células T de IL13 ζ habían aumentado a un nivel similar al del grupo tratado simulado (control). Los dominios de señalización coestimuladores de CD28 y el 4-1BB así potenciaron y/o prolongaron el control del crecimiento tumoral mediante las células T genéticamente redirigidas.

Ejemplo 6. Preparación de las células T adecuadas para terapia.

Los linfocitos T se obtuvieron de un paciente mediante leucaféresis, y las células T autólogas fueron alteradas genéticamente para expresar el CAR, luego, se administraron de nuevo al paciente para lograr la terapia anticáncer.

Para preparar las células T de IL13 ζ ⁺ adecuadas para uso terapéutico, las células mononucleares se separaron de la sangre sometida a leucoféresis por centrifugación sobre Ficoll™ de grado clínico. Las PBMC se lavaron dos veces en solución salina regulada con fosfato estéril que contenía EDTA 0.526 mM y luego una vez en PBS estéril, y se suspendieron en medio de cultivo que consistía de RPMI 1640 HEPES, 10% de FCS inactivado por calor, y L-glutamina 4 mM. Las células T presentes en las PBMC del paciente se activaron policlonalmente mediante la adición de Orthoclone OKT3™ (30 ng/ml) al cultivo. Los cultivos de células fueron entonces incubados en frascos de cultivo de tejido T-75 ventilados en la incubadora designada del sujeto de estudio. Veinticuatro horas después de la iniciación del cultivo, se agregó IL2rh a 25 U/ml. Tres días después de la iniciación del cultivo, las PBMC se recolectaron, se centrifugaron y se resuspendieron en regulador de electroporación hipotónica a 20x10⁶ células/ml. Veinticinco microgramos del plásmido IL13 ζ /HyTK-pMG, junto con 400 μ L de suspensión celular, se agregaron a una probeta estéril de electroporación de 0.2 cm. Cada probeta se somete a un único pulso eléctrico de 250 V/40 μ s y de nuevo se incuba durante diez minutos a temperatura ambiente. Las células supervivientes se recolectaron de las probetas, se agruparon, y se resuspendieron en medios de cultivo que contenían 25 U/mL de IL2rh. Los matraces se colocaron en la incubadora de cultivo de tejidos designado del paciente. Tres días después de la electroporación, se agregó la higromicina a las células a una concentración final de 0.2 mg/mL. Las PMBC electroporadas se cultivaron durante un total de 14 días con los medios y la suplementación de IL2 cada 48 horas.

La clonación de CD8⁺ CTL resistentes a la higromicina a partir de PBMC del paciente activada con OKT3 electroporada se inició en el día 14 de cultivo. Brevemente, las PBMC viables del paciente se agregaron a una mezcla de 100x10⁶ PBMC alimentadoras irradiadas criopreservadas y 20x10⁶ TM-LCL irradiadas (células linfoblastoides transformadas con EBV que actúan como células alimentadoras) en un volumen de 200 mL de medio de cultivo que contiene 30 ng/mL de OKT3 y 50 U/ml de IL2rh. Esta mezcla se sembró 0.2 ml en cada pozo de 10 placas de clonación de 96 pozos. Las placas se envolvieron en lámina de aluminio para disminuir la pérdida por evaporación y se colocan en la incubadora de cultivo de tejidos designado del paciente. El día 19 de cultivo, cada pozo recibió higromicina a una concentración final de 0.2 mg/mL. Los pozos se inspeccionaron visualmente para excrecencia celular en un microscopio invertido en el Día 30 y los pozos positivos fueron marcados para la reestimulación.

El contenido de cada pozo de clonación con el crecimiento celular se transfirieron individualmente a matraces T-25 que contienen 50x10⁶ PBMC irradiadas, 10x10⁶ LCL irradiadas, y 30 ng/mL de OKT3 en 25 mL de medios de cultivo de tejidos. En los días 1, 3, 5, 7, 9, 11, y/o 13 después de la reestimulación, los matraces recibieron 50 U/ml de IL2rh y 5 ml medio fresco cuando fue necesario. En el día 5 del ciclo de estimulación, los matraces también se suplementaron con higromicina 0.2 mg/ml. Catorce días después de la siembra, las células se recolectaron, se contaron y se volvieron a estimular en matraces T-75 que contenían 100 x 10⁶ PBMC irradiadas, 20 x 10⁶ TM-LCL irradiadas y 30 ng/ml de OKT3 en 50 mL de medio de cultivo de tejidos. Los matraces recibieron adiciones al cultivo de IL2rh e higromicina como se delineó más arriba.

5 Las CTL seleccionadas para expansión para su posible uso en terapia se analizaron por inmunofluorescencia en un clasificador de células activado por fluorescencia, utilizando anticuerpos WT/31 ($\alpha\beta$ TCR), Leu 2A (CD8), y OKT4 (CD4) monoclonales conjugados con FITC para confirmar el fenotipo del clon ($\alpha\beta$ TCR⁺, CD4⁻, CD8⁺, e IL13⁺). Los criterios para la selección de clones para uso clínico incluyen uniforme TCR $\alpha\beta$ ⁺, CD4⁻, CD8⁺ y ⁺ IL13 en comparación con anticuerpo conjugado con PE/FITC de control de isotipo. Un sitio único de integración cromosómica del vector de plásmido se confirmó por análisis de transferencia Southern. El ADN de clones de células T genéticamente modificadas se rastreó con una sonda de ADN específica para el vector de plásmido.

10 La expresión de IL13-CD28-41BB ζ se determinó mediante transferencia western para detectar la proteína del receptor quimérico usando el anticuerpo de cadena zeta anti- CD3 ζ descrito anteriormente de acuerdo con métodos estándar. Brevemente, los lisados de células enteras de clones de células T transfectadas se generaron mediante la lisis de 2×10^7 células lavadas en 1 mL de regulador RIPA (PBS, 1% de NP40, 0.5% de desoxicolato de sodio, 0.1% de SDS) que contenía 1 tableta/10 mL de Cóctel Inhibidor Completo de Proteasa. Después de una incubación de 80 minutos en hielo, se recolectó sobrenadante de lisado de células completas centrifugadas y se hirvieron en un volumen igual de regulador de carga bajo condiciones de reducción y luego se sometió a electroforesis en SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 12% prefabricado. Después de la transferencia a nitrocelulosa, la membrana fue entonces bloqueada en solución Blotto™ que contenía 4% de leche en polvo sin grasa en T-TBS (0.1% de Tween 20™ en solución salina regulada con Tris, pH 8.0) durante una hora. Las membranas se lavaron en T-TBS, luego se incubaron con el anticuerpo primario 8D3 monoclonal CD3 ζ antihumano de ratón (Pharmingen™) a una concentración de 0.5 μ g/mL durante una hora. Después de cuatro lavados adicionales en T-TBS, las membranas se incubaron con una dilución 1:3000 (en solución Blotto™) de anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina de IgG antirratón de cabra durante 1 hora. Antes de la adición de sustrato, las membranas fueron enjuagadas en T-TBS, luego se incubaron con 3 mL de solución de sustrato de fosfatasa (kit Bio-Rad™ ImmunoStar™) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

25 Las dosis adecuadas para un efecto terapéutico están entre aproximadamente 10^6 y aproximadamente 10^9 células por dosis, preferiblemente en una serie de ciclos de dosificación. Un régimen de dosificación preferido consiste de cuatro ciclos de dosificación en una semana de dosis crecientes, comenzando en aproximadamente 10^7 células en el día 0, incrementando gradualmente hasta una dosis objetivo de aproximadamente 10^8 células en día 5. Modos adecuados de administración incluyen intravenosa, subcutánea, intracavitaria (por ejemplo mediante dispositivo de acceso a reservorio), intraperitoneal, e inyección directa en una masa tumoral.

30 Ejemplo 7. Tratamiento del glioma recurrente intracraneal en pacientes humanos.

El tratamiento de glioma o cualquier otro tipo de cáncer como se describe aquí utilizando células T que expresan IL13-CD28-41BB ζ , de acuerdo con esta invención se realizó como sigue. Clones de células T, como se describe en el Ejemplo 6, se seleccionaron preferiblemente para:

- a. fenotipo de la superficie celular de TCR α/β ⁺, CD4, CD8⁺, IL13⁺;
- 35 b. la presencia de una copia única de ADN de vector plásmido integrado cromosómicamente;
- c. expresión de la proteína IL13-CD28-41BB ζ ;
- d. lisis específica de objetivos IL13R $\alpha 2$ ⁺ humano;
- e. dependencia de IL2 exógena para el crecimiento *in vitro*;
- f. micoplasma, hongos y esterilidad bacteriana y niveles de endotoxinas de menos de 5 EU/ml; y
- 40 g. sensibilidad *in vitro* de clones a ganciclovir.

45 Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica a partir del paciente mediante leucoféresis, preferiblemente después de la recuperación de la cirugía de resección inicial y en un tiempo de al menos tres semanas desde la disminución de esteroides y/o su más reciente quimioterapia sistémica. El rendimiento de la célula mononuclear objetivo con leucoféresis fue en general 5×10^9 y el número objetivo de los clones de células T citolíticas resistentes a higromicina fue 25. En general, se han identificado al menos cinco clones que cumplen con todos los parámetros de control de calidad para la expansión *in vitro*. Los clones fueron criopreservados y los pacientes monitorizados por exámenes radiográficos y clínicos en serie. Cuando se documentó recurrencia de la progresión de la enfermedad, los pacientes fueron sometidos a una re-resección y/o la colocación de un dispositivo de acceso a reservorio para suministrar células T a la cavidad de resección tumoral.

50 Después de la recuperación de la cirugía y disminución de esteroides, si se aplica, el paciente comenzó la terapia de células T de la siguiente manera. El paciente recibió un objetivo de al menos cuatro ciclos en una semana de terapia. Durante el primer ciclo, el aumento de la dosis de células procedía de una dosis inicial el día 0 de aproximadamente 10^7 células, seguido por aproximadamente 5×10^7 células en el día 3 a una dosis objetivo de

aproximadamente 10^8 células en el Día 5. El ciclo 2 comenzó tan pronto como en una semana desde comienzo del ciclo 1. En los días de la administración de células T, clones expandidos se procesaron de manera aséptica lavándolos dos veces en 50cc de PBS, luego se resuspendieron en solución salina normal libre de conservantes farmacéuticos en un volumen que dio como resultado la dosis de células para el suministro del paciente en 2 mL. Preferiblemente, las células T se instilaron durante 5-10 minutos, seguido de un lavado de 2 mL de PFN administrada durante 5 minutos. La respuesta a la terapia se determinó MRI +/- gadolinio, con espectroscopia.

5 En general, las dosis de células fueron al menos un registro de menos de la dosis administrada en los estudios que emplean células LAK intracavitaria (dosis de células individuales de hasta 10^9 y el número de células acumuladas tan altas como 2.75×10^{10}), Tilos expandidas ex vivo (hasta 10^9 células/dosis) y linfocitos ilo-reactivos (dosis inicial de células 10^9 con dosis de células acumuladas hasta 51.5×10^8). La dosis baja de dosificación repetitiva es favorecida para evitar respuestas inflamatorias potencialmente peligrosas que podrían ocurrir con instilaciones individuales de gran número de células. Cada infusión consistió preferiblemente de un clon de células T individual, y el mismo clon se administró preferiblemente a lo largo de curso del tratamiento del paciente.

10 Aquellos pacientes que demuestran la regresión del tumor con enfermedad residual en MRI pueden tener decursos adicionales de terapia comenzando no antes de la Semana 7, que consisten en la repetición de los Ciclos 3 y 4, seguido por una semana de descanso/reestadificación dato que estos tratamientos son bien tolerados hasta el momento en que la progresión de la enfermedad está documentada, o se logra una respuesta completa (RC) sobre la base de la evaluación radiográfica. Las toxicidades máximas generalmente aceptadas son menores de grado 3, sin embargo esto es a discreción del médico tratante.

15 El tratamiento con ganciclovir conduce a la ablación de los clones de $CAR^+ HyTK^+ CD8^+$ CTL. Por lo tanto, cualquier efecto secundario asociados con la terapia (dolor de cabeza, fiebre, escalofríos, náuseas, etc.) que puede ocurrir puede ser administrado usando tratamientos establecidos apropiados para la condición. Por ejemplo, el paciente puede recibir ganciclovir si se observa cualquier nueva toxicidad de grado 3 que progresa hasta el grado 4, o cualquier toxicidad relacionada con el tratamiento de grado 4 que, a juicio del médico tratante, pone al paciente en riesgo médico significativo. El ganciclovir administrado parenteralmente se dosifica a 10 mg/kg/día dividida cada 12 horas. Los pacientes deben ser hospitalizados por las primeras 72 horas de tratamiento con ganciclovir a para propósitos de monitorización. Si los síntomas no responden a ganciclovir dentro de las 48 horas, se pueden agregar agentes inmunosupresores adicionales, incluyendo pero no limitado a los corticosteroides y ciclosporina, a la discreción del médico tratante. Si las toxicidades son severas, también se puede utilizar decadron y/u otros fármacos inmunosupresores junto con ganciclovir a discreción del médico tratante.

20 Estudios de seguridad preliminares utilizando el protocolo delineado más arriba, donde se administraron clones de CTL que expresan IL13-CAR a pacientes humanos con glioma recurrente intracraneal, indicaron que de los eventos adversos que tuvieron posible correlación con la administración intracavitaria de las células T, el único evento Grado 3 han sido los dolores de cabeza que se produjeron con la administración de 10^8 células en cada uno de los dos pacientes tratados hasta la fecha. En ningún momento fueron eventos adversos de grado 4 o 5 que se encuentran asociados con la administración de las células T alteradas genéticamente. Así, el perfil global de seguridad de esta terapia de transferencia adoptiva aquí fue aceptable.

Ejemplos 8-12. Moléculas CAR de ejemplo. (Comparación)

Las figuras 14 y 16-18 proveen las secuencias de los CAR de comparación.

40 La figura 14 provee la secuencia de un CAR de IL13-IgG₄-cd28tm-CD28gg-Zeta (CO) (SEQ ID NO: 36). Esta secuencia codifica (1) la molécula de IL13 con la mutación E13Y (que es el ligando para el receptor de la superficie del tumor IL13R α 2 en la superficie del tumor (IL13)), (2) la porción Fc del dominio extracelular G4 isotipo de inmunoglobulina (IgG₄), (3) la porción transmembrana de la molécula coestimuladora CD28 (cd28tm), (4) el dominio de señalización de CD28 con dos leucinas cambiadas a glicinas para el propósito de la expresión incrementada (CD28gg), y (5) el dominio de señalización de la cadena CD3 ζ del receptor de células T (Zeta). Todos los segmentos fueron de codones optimizados (CO) para la expresión de mamífero incrementada. La porción subrayada de la secuencia es la secuencia de codificación para CD28gg.

45 La Figura 15, de acuerdo con la presente invención provee la secuencia de un CAR DE IL13-IgG₄-cd4tm-CD28-4-1BB-Zeta (también denominado aquí como IL13-CD28-41BB ζ ; SEQ ID NO: 37). Esta secuencia codifica (1) la molécula de IL13 con la mutación E13Y (que es el ligando para el receptor de la superficie del tumor IL13R α 2 en la superficie del tumor (IL13)), (2) la porción Fc del dominio extracelular G4 isotipo de inmunoglobulina (IgG₄), (3) la porción transmembrana de CD4 (cd4tm); el dominio de señalización de la molécula coestimuladora CD28 (CD28) (4) el dominio de señalización de la molécula coestimuladora 4-1BB (4-1BB), y (5) el dominio de señalización de la cadena CD3 ζ del receptor de células T (Zeta). La parte subrayada de la secuencia codifica CD28 y la porción en negrilla de la secuencia que codifica 4-1BB.

55 La Figura 16 provee la secuencia de un CAR de IL13-IgG₄-cd28tm-CD28-OX40-Zeta (SEQ ID NO: 38). Esta secuencia codifica (1) la molécula de IL13 con la mutación E13Y (que es el ligando para el receptor de la superficie

5 del tumor IL13R α 2 en la superficie del tumor (IL13)), (2) la porción Fc del dominio extracelular G4 isotipo de inmunoglobulina (IgG₄), (3) la porción transmembrana de la molécula coestimuladora CD28 (cd28tm), (4) el dominio de señalización de CD28 (CD28), (5) el dominio de señalización de la molécula coestimuladora OX-40 (OX40), y (6) el dominio de señalización de la cadena CD3 del receptor de células T (Zeta). La secuencia de codificación de cd28tm está subrayada (aminoácidos 364-390); la secuencia que codifica CD28 está en cursiva (aminoácidos 391-431); la secuencia que codifica OX40 está en negrilla (aminoácidos 432-467); y la secuencia que codifica Zeta está a la vez subrayada y en cursiva (aminoácidos 468-580).

10 La Figura 17 provee la secuencia de un CAR de IL13-IgG₄-cd28tm-CD28gg-4-1BB-Zeta (SEQ ID NO: 39). Esta secuencia codifica (1) la molécula de IL13 con la mutación E13Y (que es el ligando para el receptor de la superficie del tumor IL13R α 2 en la superficie del tumor (IL13)), (2) la porción Fc del dominio extracelular G4 isotipo de inmunoglobulina (IgG₄), (3) la porción transmembrana de la molécula coestimuladora CD28 (cd28tm), (4) el dominio de señalización de CD28 con dos leucinas cambiadas a glicinas para el propósito de la expresión incrementada (CD28gg), (5) el dominio de señalización de la molécula coestimuladora 4-1BB (4-1BB), y (6) el dominio de señalización de la cadena CD3 ζ del receptor de células T (Zeta). La porción subrayada de la secuencia codifica CD28gg y la porción en negrita de la secuencia codifica 4-1BB.

20 La Figura 18 provee la secuencia de un CAR de IL13-IgG₄-cd28tm-CD28gg¹⁹⁹-4-1BB-Zeta (SEQ ID NO: 40). Esta secuencia codifica (1) la molécula de IL13 con la mutación E13Y (que es el ligando para el receptor de la superficie del tumor IL13R α 2 en la superficie del tumor (IL13)), (2) la porción Fc del dominio extracelular G4 isotipo de inmunoglobulina (IgG₄), (3) la porción transmembrana de la molécula coestimuladora CD28 (cd28tm), (4) el dominio de señalización de CD28 con dos leucinas cambiadas a glicinas para el propósito de la expresión incrementada, y su dominio quinasa eliminado para el propósito de remover su actividad de señalización (esto es, como un control negativo para la SEC ID NO: 39) (CD28gg¹⁹⁹), (5) el dominio de señalización de la molécula coestimuladora 4-1BB (4-1BB), y (6) el dominio de señalización de la cadena CD3 ζ del receptor de células T (Zeta). La parte subrayada de la secuencia codifica CD28gg¹⁹⁹ y la parte en negrita de la secuencia codifica 4-1 BB.

25 Listado de secuencias

<110> Jensen, Michael

<120> Método y composiciones para el funcionamiento potenciado del efector antitumoral de células T

<130> 1954-504

30 <150> 61/091,915

<151> 2008-08-26

<160> 53

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

35 <211> 132

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 553 421 T3

Met Ala Leu Leu Leu Thr Thr Val Ile Ala Leu Thr Cys Leu Gly Gly
 1 5 10 15

Phe Ala Ser Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Tyr Leu
 20 25 30

Ile Glu Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys
 35 40 45

Asn Gly Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys
 50 55 60

Ala Ala Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu
 65 70 75 80

Lys Thr Gln Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala
 85 90 95

Gly Gln Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala
 100 105 110

Gln Phe Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu
 115 120 125

Gly Arg Phe Asn
 130

<210> 2

<211> 416

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

tatgaattca tggcgctttt gttgaccacg gtcattgctc tcaactgcct tggcggcttt 60

gcctccccag gccctgtgcc tcctctaca gccctcaggt acctcattga ggagctggtc 120

aacatcacc agaaccagaa ggctccgctc tgcaatggca gcatggtatg gagcatcaac 180

ctgacagctg gcatgtaactg tgcagccctg gaatccctga tcaacgtgctc aggctgcagt 240

gccatcgaga agaccagag gatgctgagc ggattctgcc cgcacaaggt ctcagctggg 300

cagttttcca gcttgcattg ccgagacacc aaaatcgagg tggcccagtt tgtaaaggac 360

ctgctcttac atttaaagaa actttttcgc gagggacggt tcaactgagg atccga 416

ES 2 553 421 T3

<210> 3

<211> 416

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5 <400> 3

```

atacttaagt accgcgaaaa caactggtgc cagtaacgag agtgaacgga accgccgaaa      60
cggagggggtc cgggacacgg agggagatgt cgggagtcca tggagtaact cctcgaccag      120
ttgtagtggg tcttggctct ccgagggcgg acgttaccgt cgtaccatac ctcgtagttg      180
gactgtcgac cgtacatgac acgtcggggac cttagggact agttgcacag tccgacgtca      240
cggtagctct tctgggtctc ctacgactcg cctaagacgg gcgtggtcca gagtcgacct      300
gtcaaaaggt cgaacgtaca ggctctgtgg ttttagctcc accgggtcaa acatttcctg      360
gacgagaatg taaatttctt tgaaaaagcg ctccctgcca agttgactcc taggct          416
    
```

<210> 4

<211> 497

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 4

```

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

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg
          20              25              30

Tyr Leu Ile Glu Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro
          35              40              45

Leu Cys Asn Gly Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met
 50              55              60
    
```

ES 2 553 421 T3

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

ES 2 553 421 T3

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 305 310 315 320

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
 325 330 335

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 340 345 350

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Met Ala Leu Ile Val
 355 360 365

Leu Gly Gly Val Ala Gly Leu Leu Leu Phe Ile Gly Leu Gly Ile Phe
 370 375 380

Phe Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln
 385 390 395 400

Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu
 405 410 415

Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly
 420 425 430

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

Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
 450 455 460

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

Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
 485 490 495

Arg

<210> 5

<211> 1522

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

ES 2 553 421 T3

<400> 5

atctctagag cgcaccat gcttctctg gtgacaagcc ttctgctctg tgagttacca	60
caccagcat tcctcctgat ccagggcct gtgcctccct ctacagccct caggtacctc	120
attgaggagc tggtaacat caccagaac cagaaggctc cgctctgcaa tggcagcatg	180
gtatggagca tcaacctgac agctggcatg tactgtgcag ccttgaatc cctgatcaac	240
gtgtcaggct gcagtgccat cgagaagacc cagaggatgc tgagcggatt ctgcccgcac	300
aaggtctcag ctggcagtt ttccagcttg catgtccgag acacaaaat cgaggtggcc	360
cagtttgtaa aggacctgct cttacattta aagaaacttt ttcgcgaggg acggttcaac	420
gagtccaaat atggtcccc atgcccacca tgcccagcac ctgagttcct ggggggacca	480
tcagtcttcc tgttcccc aaaacccaag gacactctca tgatctcccg gaccctgag	540
gtcacgtgcg tgggtgtgga cgtgagccag gaagacccc aggtccagtt caactggtac	600
gtggatggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc	660
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag	720
tacaagtgca aggtctcaa caaaggcctc ccgtcctcca tcgagaaac catctccaaa	780
gcaaagggc agccccgaga gccacaggtg tacaccctgc cccatccca ggaggagatg	840
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc	900
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg	960
gactccgacg gtccttctt cctctacagc aggctaaccg tggacaagag caggtggcag	1020
gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcaacaaca ctacacacag	1080
aagagcctct ccctgtctct gggtaaaatg gccctgattg tgctgggggg cgtcgccggc	1140
ctctgcttt tcattgggct aggcattctt ttccagagtga agttcagcag gagcgcagac	1200
gccccgcgt accagcaggg ccagaaccag ctctataacg agtcaatct aggacgaaga	1260
gaggagtacg atgttttga caagagacgt ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg	1320
agaaggaaga accctcagga aggcctgtac aatgaactgc agaaagataa gatggcggag	1380
gcctacagtg agattgggat gaaaggcgag cgccggaggg gcaaggggca cgatggcctt	1440
taccagggtc tcagtacagc caccaaggac acctacgacg cccttccat gcaggccctg	1500
ccccctcgct aagcgccgc at	1522

<210> 6

<211> 1522

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

ES 2 553 421 T3

<400> 6

tagagatctc ggcggtggta cgaagaggac cactgttcgg aagacgagac actcaatggt	60
gtgggtcgta aggaggacta gggtcggga cacggaggga gatgtcggga gtccatggag	120
taactcctcg accagttgta gtgggtcttg gtcttccgag gcgagacggt accgtcgtac	180
catacctcgt agttggactg tcgaccgtac atgacacgtc gggaccttag ggactagtgtg	240
cacagtccga cgtcacggtg gctcttctgg gtctctacg actcgcctaa gacgggctgtg	300
ttccagagtc gaccctcaa aaggtcgaac gtacaggctc tgtggtttta gctccaccgg	360
gtcaaacatt tcctggacga gaatgtaa atctttgaaa aagcgtccc tgccaagtgtg	420
ctcaggttta taccaggggg tacgggtggt acgggtcgtg gactcaagga cccccctggt	480
agtcagaagg acaagggggg ttttgggttc ctgtgagagt actagagggc ctggggactc	540
cagtgcacgc accaccacct gcactcggtc cttctggggc tccaggtcaa gttgaccatg	600
cacctaccgc acctccacgt attacggttc tgtttcggcg cctcctcgt caagttgtcg	660
tgcatggcac accagtcgca ggagtggcag gacgtggctc tgaccgactt gccgttcctc	720
atgttcacgt tccagagggt gtttccggag ggcaggagggt agctcttttg gtagaggttt	780
cggtttcccg tcggggctct cgggtgccac atgtgggacg ggggtaggggt cctcctctac	840
tggttcttgg tccagtcgga ctggacggac cagtttccga agatggggtc gctgtagcgg	900
cacctcacc tctcgttacc cgtcggcctc ttgttgatgt tctggtgcgg agggcacgac	960
ctgaggctgc cgaggaagaa ggagatgtcg tccgattggc acctgttctc gtccaccgtc	1020
ctccccttac agaagagtac gaggcactac gtactccgag acgtgttgggt gatgtgtgtc	1080
ttctcggaga gggacagaga ccattttac cgggactaac acgaccccc gcagcggccg	1140
gaggacgaaa agtaaccoga tccgtagaag aagtctcact tcaagtcgtc ctgcgctctg	1200
cgggggcgca tggcgtccc ggtcttggtc gagatattgc tcgagttaga tctgtctct	1260
ctcctcatgc taaaaacct gttctctgca cggccctgg gactctacc cccttcggc	1320
tcttcttct tgggagtct tccggacatg ttacttgacg tctttctatt ctaccgctc	1380
cggatgtcac tctaacccta ctttccgctc gcggcctccc cgttccccgt gctaccgaa	1440
atgggtccag agtcatgtcg gtggttcctg tggatgtgtc gggaagtgtc cgtccgggac	1500
gggggagcga ttcgcccggc ta	1522

<210> 7

<211> 84

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 7

ES 2 553 421 T3

atctctagag cgcaccat gcttctctg gtgacaagcc ttctgctctg tgagttacca 60
 caccagcat tcctcctgat ccca 84

<210> 8

<211> 336

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 8

ggcctgtgc ctccctctac agccctcagg tacctcattg aggagctggt caacatcacc 60
 cagaaccaga aggctccgct ctgcaatggc agcatggtat ggagcatcaa cctgacagct 120
 ggcatgtact gtgcagccct ggaatccctg atcaacgtgt caggctgcag tgccatcgag 180
 aagaccaga ggatgctgag cggattctgc cgcacaagg tctcagctgg gcagttttcc 240
 agcttgcattg tccgagacac caaaatcgag gtggcccagt ttgtaaagga cctgctctta 300
 catttaaga aactttttcg cgagggacgg ttcaac 336

<210> 9

<211> 686

10 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 9

gagtccaaat atggtcccc atgcccacca tgcccagcac ctgagttcct ggggggacca 60
 tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag gacactctca tgatctcccg gaccctgag 120
 gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccag gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 180
 gtggatggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc 240
 acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggtgaa cggcaaggag 300
 tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc cgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa 360
 gccaaagggc agccccgaga gccacaggtg tacaccctgc cccatccca ggaggagatg 420
 accaagaacc aggtcagcct gacctgctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 480
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 540
 gactccgacg gtccttctt cctctacagc aggctaaccg tggacaagag caggtggcag 600
 gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacacag 660
 aagagcctct cctgtctct gggtaa 686

<210> 10

15 <211> 67

ES 2 553 421 T3

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 10

```
aatggccctg attgtgctgg ggggcgctgc cggcctcctg cttttcattg ggctagggcat 60
cttcttc 67
```

5 <210> 11

<211> 339

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 11

```
agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc 60
tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg ttttggacaa gagacgtggc 120
cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctgaggaagg cctgtacaat 180
gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 240
cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggctctca gtacagccac caaggacacc 300
tacgacgccc ttcacatgca ggcctgccc cctcgctaa 339
```

10

<210> 12

<211> 1092

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Vector plásmido

<400> 12

ES 2 553 421 T3

gagtccaaat atggtccccc atgcccacca tgcccagcac ctgagttcct ggggggacca	60
tcagtotttc tgttccccc aaaacccaag gacactetca tgatctcccg gaccctgag	120
gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccag gaagaccccg aggtccagtt caactggtac	180
gtggatggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc	240
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagc actggctgaa cggcaaggag	300
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa	360
gccaaagggc agccccgaga gccacaggtg tacaccctgc ccccatccca ggaggagatg	420
accaagaacc aggtcagcct gacctgctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc	480
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg	540
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aggctaaccg tggacaagag caggtggcag	600
gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacacag	660
aagagcctct ccctgtctct gggtaaaatg gccctgattg tgctgggggg cgtcgccggc	720
ctcctgcttt tcattgggct aggcattctt ttcagagtga agttcagcag gagcgagac	780
gccccgcgt accagcaggg ccagaaccag ctctataacg agtcaatct aggacgaaga	840
gaggagtacg atgttttga caagagacgt ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg	900
agaaggaaga accctcagga aggcctgtac aatgaactgc agaaagataa gatggcggag	960
gcctacagtg agattgggat gaaaggcgag cgccggaggg gcaaggggca cgatggcctt	1020
taccagggtc tcagtacagc caccaaggac acctacgacg cccttcacat gcaggccctg	1080
ccccctcgct aa	1092

<210> 13

<211> 6770

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Vector plásmido

<400> 13

ES 2 553 421 T3

tcgaaggatc tgcgatcgct ccggtgcccc tcagtgggca gagcgcacat cccccacagt	60
ccccgagaag ttggggggag gggtcggcaa ttgaaccggg gcctagagaa ggtggcgcgg	120
ggtaaactgg gaaagtgatg tcgtgtactg gctccgcctt tttcccagg gtgggggaga	180
accgtatata agtgcagtag tcgccgtgaa cgttcttttt cgcaacgggt ttgccgccag	240
aacacagctg aagcttcgag gggctcgcac ctctccttca cgcgccccgc gcctacctg	300
aggccgccat ccacgccggg tgagtcgcgt tctgcccctt cccgcctgtg gtgcctcctg	360
aactgcgtcc gccgtctagg taagtttaaa gctcaggtcg agaccgggcc tttgtccggc	420
gctcccctgg agcctacctg gactcagccg gctctccacg ctttgccctga ccctgcttgc	480
tcaactctac gtctttgttt cgttttctgt tctgcccctt tacagatcca agctgtgacc	540
ggcgcctacg taagtgatat ctactagatt tatcaaaaag agtggtgact tgtgagcgt	600
cacaattgat acggattcat cgagagggac acgtcgacta ctaaccttct tctctttcct	660
acagctgaga tcaccctaga gccgccacca tgcttctcct ggtgacaagc cttctgctct	720
gtgagttacc acaccagca ttctctctga tcccaggccc tgtgcctccc tctacagccc	780
tcaggtacct cattgaggag ctggtcaaca tcaccagaa ccagaaggct ccgctctgca	840
atggcagcat ggtatggagc atcaacctga cagctggcat gtactgtgca gccctggaat	900
ccctgatcaa cgtgtcaggc tgcagtgcca tcgagaagac ccagaggatg ctgagcggat	960
tctgcccgca caaggtctca gctgggcagt tttccagctt gcatgtccga gacacaaaa	1020
tcgaggtggc ccagtttgta aaggacctgc tcttacattt aaagaaactt tttcgcgagg	1080
gacggttcaa cgagtccaaa tatgggtcccc catgcccacc atgcccagca cctgagttcc	1140
tggggggacc atcagctctc ctgttcccc caaaaccaa ggacactctc atgatctccc	1200
ggaccctga ggtcacgtgc gtggtggtgg acgtgagcca ggaagacccc gaggtccagt	1260
tcaactggta cgtggatggc gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc	1320
agttcaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag gactggctga	1380
acggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaaggcct cccgtcctcc atcgagaaaa	1440

ES 2 553 421 T3

ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag agccacaggt gtacaccctg ccccatccc 1500
 aggaggagat gaccaagaac caggtcagcc tgacctgctt ggtcaaaggc ttctaccca 1560
 gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc 1620
 ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tctctacag caggctaacc gtggacaaga 1680
 gcaggtggca ggaggggaat gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc 1740
 actacacaca gaagagcctc tccctgtccc taggtaaaat ggccctgatt gtgtggggg 1800
 gcgtcgccgg cctcctgctt ttcattgggc taggcatctt cttcagagtg aagttcagca 1860
 ggagcgcaga cgccccgcg taccagcagg gccagaacca gctctataac gagctcaatc 1920
 taggacgaag agaggagtac gatgttttgg acaagagacg tggccgggac cctgagatgg 1980
 ggggaaagcc gagaagggaag aaccctcagg aaggcctgta caatgaactg cagaaagata 2040
 agatggcggga ggcctacagt gagattggga tgaaggcga gcgccggagg ggcaaggggc 2100
 acgatggcct ttaccagggt ctcagtacag ccaccaagga cacctacgac gcccttcaca 2160
 tgcaggccct gccccctcgc tgagcggccg gcgaaggagg cctagatcta tcgattgtac 2220
 agctagctcg acatgataag atacattgat gagtttggac aaaccacaac tagaatgcag 2280
 tgaaaaaaat gctttatttg tgaatttgt gatgctattg ctttatttgt gaaatttgtg 2340
 atgctattgc tttatttga accattataa gctgcaataa acaagttaac aacaacaatt 2400
 gcattcattt tatgtttcag gttcaggggg aggtgtggga ggttttttaa agcaagtaaa 2460
 acctctaaa atgtggtaga tccatttaa tgtagcgaa gaacatgtga gcaaaaggcc 2520
 agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc 2580
 ccctgacga gcatcaciaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac 2640
 tataaagata ccaggcgtt cccctggaa gctccctcgt gcgctctcct gttccgaccc 2700
 tgccgcttac cggatacctg tccgccttcc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcaat 2760
 gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc 2820
 acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgog ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca 2880
 acccgtaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag 2940
 cgaggatgt aggcggtgct acagagttct tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta 3000
 gaagaacagt atttggatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg 3060
 gtagctcttg atccggcaaa caaaccacog ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc 3120
 agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatctt tctacggggt 3180
 ctgacgctca gtggaacgaa aactcacggt aagggatttt ggtcatggct agttaattaa 3240

ES 2 553 421 T3

gctgcaataa acaatcatta ttttcattgg atctgtgtgt tggttttttg tgtgggcttg 3300
ggggaggggg aggccagaat gactccaaga gctacaggaa ggcaggtcag agaccccact 3360
ggacaaacag tggctggact ctgcaccata acacacaatc aacaggggag tgagctggat 3420
cgagctagag tccgttacat aacttacggg aatggccccg cctggctgac cgcccaacga 3480
ccccgcca ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgcaa tagggacttt 3540
ccattgacgt caatgggtgg agtatttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt 3600
gtatcatatg ccaagtacgc ccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc cgcctggca 3660
ttatgccag tacatgacct tatgggactt tctacttgg cagtacatct acgtattagt 3720
catcgctatt accatggtga tgcggttttg gcagtacatc aatgggcgtg gatagcggtt 3780
tgactcacgg ggatttccaa gtctccacc cattgacgtc aatgggagtt tgttttggca 3840
ccaaaatcaa cgggactttc caaatgtcg taacaactcc gcccattga cgcaaatggg 3900
cggtaggcgt gtacgggtgg aggtctatat aagcagagct cgtttagtga accgtcagat 3960
cgctggaga cgccatccac gctgttttga cctccataga agacaccggg accgatccag 4020
cctccgcggc cgggaacggt gcattggaac ggggattccc cgtgccaaga gtgacgtaag 4080
taccgcctat agagtctata ggcccaccta gttgtgaccg gcgcctagtg ttgacaatta 4140
atcatcggca tagtataata cgactcacta taggagggcc accatgtoga ctactaacct 4200
tcttctctt cctacagctg agatcaccgg taggagggcc atcatgaaa agcctgaact 4260
caccgcgacg tctgtcgcga agtttctgat cgaaaagttc gacagcgtct ccgacctgat 4320
gcagctctcg gagggcgaag aatctcgtgc tttcagcttc gatgtaggag ggcgtggata 4380
tgtcctgcgg gtaaatagct gcgccgatgg tttctacaaa gatcgttatg tttatcggca 4440
cttgcacog gccgcgctcc cgattccgga agtgcttgac attggggaat tcagcgagag 4500
cctgacctat tgcactctcc gccgtgcaca ggggtgtcag ttgcaagacc tgctgaaac 4560
cgaactgccc gctgttctgc aaccgctgc ggagctcatg gatgcatcg ctgcgccga 4620
tcttagccag acgagcgggt tcggcccatt cggaccgcaa ggaatcggtc aatacactac 4680
atggcgtgat ttcatatgcg cgattgctga tccccatgtg tctactggc aaactgtgat 4740
ggacgacacc gtcagtgcgt ccgtcgcgca ggctctcgat gagctgatgc tttgggcccga 4800
ggactgcccc gaagtccggc acctcgtgca cgcggatttc ggctccaaca atgtcctgac 4860
ggacaatggc cgcataacag cggtcattga ctggagcgag gcgatgttcg gggattccca 4920
atacagagtc gccaacatct tcttctggag gccgtggttg gcttgatgg agcagcagac 4980
gcgctacttc gagcggaggc atccggagct tgcaggatcg ccgcggtcc gggcgtatat 5040
gctccgcatt ggtcttgacc aactctatca gagcttggtt gacggcaatt tcgatgatgc 5100

ES 2 553 421 T3

agcttgggcg cagggtcgat gcgacgcaat cgtccgatcc ggagccggga ctgtcgggcg 5160
 tacacaaatc gcccgcagaa gcgcggccgt ctggaccgat ggctgtgtag aagtcgcgtc 5220
 tgcgttcgac caggctgcgc gttctcgcgg ccatagcaac cgacgtacgg cgttgcgccc 5280
 tcgccggcag caagaagcca cggaagtccg cccggagcag aaaatgcca cgctactgcg 5340
 ggtttatata gacggtcccc acgggatggg gaaaaccacc accacgcaac tgctggtggc 5400
 cctgggttcg cgcgacgata tcgtctacgt acccgagccg atgacttact ggcggtgct 5460
 gggggcttcc gagacaatcg cgaacatcta caccacacaa caccgcctcg accaggtga 5520
 gatatcggcc ggggacgcgg cggtggtaat gacaagcgc cagataacaa tgggcatgcc 5580
 ttatgccgtg accgacgcgg ttctggctcc tcatatcggg ggggaggctg ggagctcaca 5640
 tgccccgcc ccggccctca ccctcatctt cgaccgccat cccatcgccg ccctcctgtg 5700
 ctaccggcc gcgcggtacc ttatgggcag catgaccccc caggccgtgc tggcgttcgt 5760
 ggcctcatc ccgccacct tgcccggcac caacatcgtg cttggggccc ttccggagga 5820
 cagacacatc gaccgcctgg ccaaacgcca gcgccccggc gagcggctgg acctggctat 5880
 gctggctgcg attcgccgg tttacgggct acttgccaat acggtgcggt atctgcagtg 5940
 cggcgggtcg tggcgggagg actggggaca gctttcgggg acggccgtgc cgccccaggg 6000
 tgccgagccc cagagcaacg cgggcccacg accccatata ggggacacgt tatttacct 6060
 gtttcgggcc ccgagttgc tggcccccaa cggcgacctg tataacgtgt ttgcctgggc 6120
 cttggacgtc ttggccaaac gcctccgttc catgcacgtc tttatcctgg attacgacca 6180
 atcgcccgcc ggctgccggg acgccctgct gcaacttacc tccgggatgg tccagaccca 6240
 cgtcaccacc cccggctcca taccgacgat atgcgacctg gcgcgcacgt ttgcccggga 6300
 gatgggggag gctaactgag tcgagaattc gctagagggc cctattctat agtgtcacct 6360
 aaatgctaga gctcgtgat cagcctcgac tgtgccttct agttgccagc catctgttgt 6420
 ttgccctcc ccggtgcctt ccttgaccct ggaagggtgc actcccactg tcctttccta 6480
 ataaaatgag gaaattgcat cgcattgtct gagtaggtgt cattctatte tgggggtgg 6540
 ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg ggaagacaat agcaggcatg cgcagggccc 6600
 aattgctcga gcggccgcaa taaaatatct ttatcttcat tacatctgtg tgttggtttt 6660
 ttgtgtgaat cgtaactaac atacgtctc catcaaaaca aaacgaaaca aaacaaacta 6720
 gcaaaatagg ctgtccccag tgcaagtgca ggtgccagaa catttctcta 6770

<210> 14

<211> 6770

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

ES 2 553 421 T3

<400> 14

agcttcctag	acgctagcga	ggccacgggc	agtcacccgt	ctcgcgtgta	gcgggtgtca	60
ggggctcttc	aacccccctc	cccagccgtt	aacttgcca	cggatctctt	ccaccgcgcc	120
ccatttgacc	ctttcactac	agcacatgac	cgaggcggaa	aaagggctcc	cacccccctc	180
tggcatatat	tcacgtcatc	agcggcactt	gcaagaaaa	gcgttgcca	aacggcggtc	240
ttgtgtcgac	ttcgaagctc	cccgagcgta	gagaggaagt	gcgcgggcgg	cgggatggac	300
tccggcggta	ggtgcggcca	actcagcgca	agacggcgga	gggcggacac	cacggaggac	360
ttgacgcagg	cggcagatcc	attcaaattt	cgagtccagc	tctggcccgg	aaacaggccg	420
cgagggaaacc	tcggatggat	ctgagtcggc	cgagaggtgc	gaaacggact	gggacgaacg	480
agttgagatg	cagaaacaaa	gcaaaagaca	agacgcggca	atgtctaggt	tcgacactgg	540
ccgcggatgc	attcactata	gatgatctaa	atagtttttc	tcacaactga	acactcgcga	600
gtgttaacta	tgcctaagta	gctctccctg	tgcagctgat	gattggaaga	agagaaagga	660
tgtcgactct	agtgggatct	cggcgggtgt	acgaagagga	ccactgttcg	gaagacgaga	720
cactcaatgg	tgtgggtcgt	aaggaggact	agggctccgg	acacggaggg	agatgtcggg	780
agtccatgga	gtaactcctc	gaccagttgt	agtgggtcct	ggtcttccga	ggcgagacgt	840
taccgtcgta	ccatacctcg	tagttggact	gtcgaccgta	catgacacgt	cgggacotta	900
gggactagtt	gcacagtccg	acgtcacggt	agctcttctg	ggtctcctac	gactcgccta	960
agacgggcgt	gttccagagt	cgaccctca	aaaggtcgaa	cgtacaggct	ctgtggtttt	1020
agctccaccg	ggtcaaacat	ttcctggacg	agaatgtaa	tttctttgaa	aaagcgtcc	1080
ctgccaagtt	gctcaggttt	ataccagggg	gtacgggtgg	tacgggtcgt	ggactcaagg	1140
acccccctgg	tagtcagaag	gacaaggggg	gttttgggtt	cctgtgagag	tactagaggg	1200
cctggggact	ccagtgcacg	caccaccacc	tgactcgggt	ccttctgggg	ctccaggtea	1260
agttgaccat	gcacctaccg	cacctccacg	tattacgggt	ctgtttcggc	gcctcctcgc	1320
tcaagttgtc	gtgcatggca	caccagtcgc	aggagtggca	ggacgtggtc	ctgaccgact	1380
tgccgttctc	catgttcacg	ttccagaggt	tgtttccgga	gggcaggagg	tagctctttt	1440
ggtagaggtt	tcggtttccc	gtcggggctc	tcggtgtcca	catgtgggac	gggggtaggg	1500
tcctcctcta	ctggttcttg	gtccagtcgg	actggacgga	ccagtttccg	aagatggggg	1560
cgctgtagcg	gcacctcacc	ctctcgttac	ccgtcggcct	ctgtttgatg	ttctgggtgcg	1620
gagggcacga	cctgaggctg	ccgaggaaga	aggagatgtc	gtccgattgg	cacctgttct	1680
cgccaccgt	cctcccccta	cagaagagta	cgaggcacta	cgactcctga	gacgtgttgg	1740

ES 2 553 421 T3

tgatgtgtgt cttctcggag agggacaggg atccatttta cggggactaa cacgaccccc 1800
 cgcagcggcc ggaggacgaa aagtaaccog atccgtagaa gaagtctcac ttcaagtcgt 1860
 cctcgcgtct gcgggggcgc atggtcgtcc cggctcttgg cgagatattg ctcgagttag 1920
 atcctgcttc tctcctcatg ctacaaaacc tgttctctgc accggcctg ggactctacc 1980
 cccctttcgg ctcttcttc ttgggagtcc ttccggacat gttacttgac gtctttctat 2040
 tctaccgcct cgggatgtca ctctaaccct actttccgct cggggcctcc ccgttccccg 2100
 tgctaccgga aatggtecca gagtcatgtc ggtggttccct gtggatgctg cgggaagtgt 2160
 acgtccggga cgggggagcg actcgcggc cgcttccctcc ggatctagat agctaacatg 2220
 tcgatcgcgc tgtactatct tatgtaacta ctcaaacctg tttggtggtg atcttacgtc 2280
 acttttttta cgaaataaac actttaaaca ctacgataac gaaataaaca ctttaaacac 2340
 tacgataacg aaataaacat tggtaatat cgacgttatt tgttcaattg ttgttgtaa 2400
 cgtaagtaaa atacaaagtc caagtcccc tccacacct ccaaaaaatt tcgttcattt 2460
 tggagatggt tacaccatct aggtaaattt acaatcgctt cttgtacact cgttttccgg 2520
 tcgttttccg gtcttggca tttttccggc gcaacgaccg caaaaaggta tccgaggcgg 2580
 ggggactgct cgtagtgttt ttagctgcga gttcagtctc caccgcttg ggctgtcctg 2640
 atatttctat ggtccgcaa gggggacctt cgagggagca cgcgagagga caaggctggg 2700
 acggcgaatg gcctatggac aggcgaaag agggaagccc ttcgcaccgc gaaagagtta 2760
 cgagtgcgac atccatagag tcaagccaca tccagcaagc gaggttcgac ccgacacacg 2820
 tgcttggggg gcaagtcggg ctggcgacgc ggaataggcc attgatagca gaactcaggt 2880
 tgggccattc tgtgctgaat agcggtgacc gtcgtcggtg accattgtcc taatcgtctc 2940
 gctccataca tccgccagga tgtctcaaga acttcaccac cggattgatg ccgatgtgat 3000
 cttcttgtca taaaccatag acgcgagacg acttcgggtca atggaagcct ttttctcaac 3060
 catcgagaac taggccgttt gtttgggtggc gaccatcgcc accaaaaaaaa caaacgttcg 3120
 tcgtctaatt cgcgtctttt tttcctagag ttcttctagg aaactagaaa agatgccccca 3180
 gactgcgagt caccttgctt ttgagtcaa ttccctaaaa ccagtaccga tcaattaatt 3240
 cgacgttatt tgtagtaat aaaagtaacc tagacacaca accaaaaaac acaccgaac 3300
 cccctcccc tccggtctta ctgaggttct cgatgtcctt ccgtccagtc tctggggtga 3360
 cctgtttgtc accgacctga gacgtggtat tgtgtgtag ttgtcccctc actcgacctc 3420
 gctcgatctc aggcaatgta ttgaatgcca tttaccgggc ggaccgactg gcgggttgct 3480
 gggggcgggt aactgcagtt attactgcat acaagggtat cattgcggtt atccctgaaa 3540
 ggtaactgca gttaccacc tcataaatgc catttgacgg gtgaaccgtc atgtagttca 3600

ES 2 553 421 T3

catagtatac ggttcatgcg ggggataact gcagttactg ccatttaccg ggcggaccgt 3660
 aatacggggtc atgtactgga ataccctgaa aggatgaacc gtcatgtaga tgcataatca 3720
 gtagcgataa tgggtaccact acgcaaaaac cgtcatgtag ttaccgcac ctatcgccaa 3780
 actgagtgcc cctaaagggtt cagaggtggg gtaactgcag ttaccctcaa acaaaaccgt 3840
 ggttttagtt gccctgaaag gttttacagc attggtgagg cgggtaact gcgtttacc 3900
 gccatccgca catgccacc tccagatata ttctgtctga gcaaatcaact tggcagtcta 3960
 gcggacctct gcggtagggtg cgacaaaact ggaggtatct tctgtggccc tggctaggtc 4020
 ggagggcgcg gcccttgcca cgtaaccttg cgcctaaggg gcacggttct cactgcattc 4080
 atggcggata tctcagatat ccgggtggat caaactggc cgcggatcac aactgttaat 4140
 tagtagccgt atcatattat gctgagtgat atcctcccgg tggtagagct gatgattgga 4200
 agaagagaaa ggatgtcgac tctagtggcc atcctcccgg tagtactttt tcggacttga 4260
 gtggcgctgc agacagcgct tcaaagacta gcttttcaag ctgtcgcaga ggctggacta 4320
 cgtcgagagc ctcccgttc ttagagcacg aaagtccaag ctacatcctc ccgcacctat 4380
 acaggacgcc catttatcga cgcggctacc aaagatgttt ctagcaatac aaatagccgt 4440
 gaaacgtagc cggcgcgagg gctaaggcct tcacgaactg taaccctta agtcgctctc 4500
 ggactggata acgtagaggg cggcacgtgt cccacagtgc aacgttctgg acggactttg 4560
 gcttgacggg cgacaagacg ttgggcagcg cctcgagtac ctacgctagc gacgccggct 4620
 agaatcggtc tgctcgccca agccgggtaa gcctggcggt ccttagccag ttatgtgatg 4680
 taccgacta aagtatacgc gctaacgact aggggtacac atagtaccg tttgacacta 4740
 cctgctgtgg cagtcacgca ggcagcgcgt ccgagagcta ctgactacg aaaccggct 4800
 cctgacgggg cttcaggccg tggagcacgt gcgcctaaag ccgaggttgt tacaggactg 4860
 cctgttaccg gcgtattgtc gccagtaact gacctgctc cgtacaagc ccctaagggt 4920
 tatgctccag cggttgtaga agaagacctc cggcaccaac cgaacatacc tcgtcgtctg 4980
 cgcgatgaag ctgcctccg taggcctcga acgtcctagc ggcgccgagg cccgcatata 5040
 cgaggcgtaa ccagaactgg ttgagatagt ctcgaaccaa ctgccgtaa agctactacg 5100
 tcgaaccgca gtcccagcta cgtcgcgta gcaggctagg cctcggccct gacagccgc 5160
 atgtgtttag cgggcgtctt cgcgccggca gacctggcta ccgacacatc ttcagcgag 5220
 acgcaagctg gtccgacgcg caagagcgcc ggtatcgttg gctgcatgcc gcaacgggg 5280
 agcggccgctc gttcttcggt gccttcaggc gggcctcgtc ttttacgggt gcgatgacgc 5340
 ccaaatatat ctgccagggg tgccttacc cttttgggtg tgggtcggtg acgaccaccg 5400

ES 2 553 421 T3

ggaccaagc gcgctgctat agcagatgca tgggctcggc tactgaatga ccgcccacga 5460
 cccccgaagc ctctgttagc gcttgtagat gtggtgtgtt gtggcgggagc tggteccact 5520
 ctatagccgg ccctgcgcc gccaccatta ctgttcgcg gtctattgtt acccgtacgg 5580
 aatacggcac tggctgcggc aagaccgagg agtatagccc ccctccgac cctcgagtgt 5640
 acggggcggg ggccgggagt gggagtagaa gctggcggta gggtagcggc gggaggacac 5700
 gatgggccgg cgcgccatgg aatacccgtc gtactggggg gtccggcacg accgcaagca 5760
 ccgggagtag ggcggctgga acgggcccgtg gttgtagcac gaaccccggg aaggcctcct 5820
 gtctgtgtag ctggcggacc ggtttgcggt cgcggggccc ctcgccgacc tggaccgata 5880
 cgaccgacgc taagcggcgc aaatgccga tgaacggtta tgccacgcca tagacgtcac 5940
 gccgcccagc accgcccctc tgacccctgt cgaaagcccc tgccggcacg gcgggggtccc 6000
 acggctcggg gtctcgttgc gcccggtgc tggggtatag ccctgtgca ataatggga 6060
 caaagcccgg gggctcaacg accgggggtt gccgctggac atattgcaca aacggaccgg 6120
 gaacctgcag aaccggtttg cggaggcaag gtacgtgcag aaataggacc taatgctggt 6180
 tagcgggccc ccgacggccc tgcgggacga cgttgaatgg aggccctacc aggtctgggt 6240
 gcagtggtag gggccgaggt atggctgcta tacgctggac cgcgctgca aacgggcccct 6300
 ctaccccctc cgattgactc agctcttaag cgatctcccg ggataagata tcacagtgga 6360
 tttacgatct cgagcgacta gtcggagctg acacggaaga tcaacggtcg gtagacaaca 6420
 aacggggagg gggcacggaa ggaactggga ccttcacgg tgagggtgac aggaaaggat 6480
 tattttactc cttaacgta gcgtaacaga ctcacccaca gtaagataag accccccacc 6540
 ccaccccgtc ctgtcgttcc cctcctaac ccttctgta tcgtccgtac gcgtcccggg 6600
 ttaacgagct cgccggcggt atttataga aataaaagta atgtagacac acaacaaaa 6660
 aacacactta gcattgattg tatgcgagag gtagttttgt tttgctttgt tttgtttgat 6720
 cgttttatcc gacaggggtc acgttcacgt ccacggtcct gtaaagagat 6770

<210> 15

<211> 497

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 15

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

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg
 20 25 30

ES 2 553 421 T3

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

ES 2 553 421 T3

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 275 280 285

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 290 295 300

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 305 310 315 320

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
 325 330 335

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 340 345 350

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Met Ala Leu Ile Val
 355 360 365

Leu Gly Gly Val Ala Gly Leu Leu Leu Phe Ile Gly Leu Gly Ile Phe
 370 375 380

Phe Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln
 385 390 395 400

Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu
 405 410 415

Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly
 420 425 430

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

Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
 450 455 460

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

Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
 485 490 495

Arg

<211> 691

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

ES 2 553 421 T3

Met Lys Lys Pro Glu Leu Thr Ala Thr Ser Val Ala Lys Phe Leu Ile
1 5 10 15

Glu Lys Phe Asp Ser Val Ser Asp Leu Met Gln Leu Ser Glu Gly Glu
20 25 30

Glu Ser Arg Ala Phe Ser Phe Asp Val Gly Gly Arg Gly Tyr Val Leu
35 40 45

Arg Val Asn Ser Cys Ala Asp Gly Phe Tyr Lys Asp Arg Tyr Val Tyr
50 55 60

Arg His Phe Ala Ser Ala Ala Leu Pro Ile Pro Glu Val Leu Asp Ile
65 70 75 80

Gly Glu Phe Ser Glu Ser Leu Thr Tyr Cys Ile Ser Arg Arg Ala Gln
85 90 95

Gly Val Thr Leu Gln Asp Leu Pro Glu Thr Glu Leu Pro Ala Val Leu
100 105 110

Gln Pro Val Ala Glu Leu Met Asp Ala Ile Ala Ala Ala Asp Leu Ser
115 120 125

Gln Thr Ser Gly Phe Gly Pro Phe Gly Pro Gln Gly Ile Gly Gln Tyr
130 135 140

Thr Thr Trp Arg Asp Phe Ile Cys Ala Ile Ala Asp Pro His Val Tyr
145 150 155 160

His Trp Gln Thr Val Met Asp Asp Thr Val Ser Ala Ser Val Ala Gln
165 170 175

Ala Leu Asp Glu Leu Met Leu Trp Ala Glu Asp Cys Pro Glu Val Arg
180 185 190

His Leu Val His Ala Asp Phe Gly Ser Asn Asn Val Leu Thr Asp Asn
195 200 205

Gly Arg Ile Thr Ala Val Ile Asp Trp Ser Glu Ala Met Phe Gly Asp
210 215 220

ES 2 553 421 T3

Ser Gln Tyr Glu Val Ala Asn Ile Phe Phe Trp Arg Pro Trp Leu Ala
 225 230 235 240

Cys Met Glu Gln Gln Thr Arg Tyr Phe Glu Arg Arg His Pro Glu Leu
 245 250 255

Ala Gly Ser Pro Arg Leu Arg Ala Tyr Met Leu Arg Ile Gly Leu Asp
 260 265 270

Gln Leu Tyr Gln Ser Leu Val Asp Gly Asn Phe Asp Asp Ala Ala Trp
 275 280 285

Ala Gln Gly Arg Cys Asp Ala Ile Val Arg Ser Gly Ala Gly Thr Val
 290 295 300

Gly Arg Thr Gln Ile Ala Arg Arg Ser Ala Ala Val Trp Thr Asp Gly
 305 310 315 320

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

His Ser Asn Arg Arg Thr Ala Leu Arg Pro Arg Arg Gln Gln Glu Ala
 340 345 350

Thr Glu Val Arg Pro Glu Gln Lys Met Pro Thr Leu Leu Arg Val Tyr
 355 360 365

Ile Asp Gly Pro His Gly Met Gly Lys Thr Thr Thr Thr Gln Leu Leu
 370 375 380

Val Ala Leu Gly Ser Arg Asp Asp Ile Val Tyr Val Pro Glu Pro Met
 385 390 395 400

Thr Tyr Trp Arg Val Leu Gly Ala Ser Glu Thr Ile Ala Asn Ile Tyr
 405 410 415

Thr Thr Gln His Arg Leu Asp Gln Gly Glu Ile Ser Ala Gly Asp Ala
 420 425 430

Ala Val Val Met Thr Ser Ala Gln Ile Thr Met Gly Met Pro Tyr Ala
 435 440 445

Val Thr Asp Ala Val Leu Ala Pro His Ile Gly Gly Glu Ala Gly Ser
 450 455 460

ES 2 553 421 T3

Ser His Ala Pro Pro Pro Ala Leu Thr Leu Ile Phe Asp Arg His Pro
465 470 475 480

Ile Ala Ala Leu Leu Cys Tyr Pro Ala Ala Arg Tyr Leu Met Gly Ser
485 490 495

Met Thr Pro Gln Ala Val Leu Ala Phe Val Ala Leu Ile Pro Pro Thr
500 505 510

Leu Pro Gly Thr Asn Ile Val Leu Gly Ala Leu Pro Glu Asp Arg His
515 520 525

Ile Asp Arg Leu Ala Lys Arg Gln Arg Pro Gly Glu Arg Leu Asp Leu
530 535 540

Ala Met Leu Ala Ala Ile Arg Arg Val Tyr Gly Leu Leu Ala Asn Thr
545 550 555 560

Val Arg Tyr Leu Gln Cys Gly Gly Ser Trp Arg Glu Asp Trp Gly Gln
565 570 575

Leu Ser Gly Thr Ala Val Pro Pro Gln Gly Ala Glu Pro Gln Ser Asn
580 585 590

Ala Gly Pro Arg Pro His Ile Gly Asp Thr Leu Phe Thr Leu Phe Arg
595 600 605

Ala Pro Glu Leu Leu Ala Pro Asn Gly Asp Leu Tyr Asn Val Phe Ala
610 615 620

Trp Ala Leu Asp Val Leu Ala Lys Arg Leu Arg Ser Met His Val Phe
625 630 635 640

Ile Leu Asp Tyr Asp Gln Ser Pro Ala Gly Cys Arg Asp Ala Leu Leu
645 650 655

Gln Leu Thr Ser Gly Met Val Gln Thr His Val Thr Thr Pro Gly Ser
660 665 670

Ile Pro Thr Ile Cys Asp Leu Ala Arg Thr Phe Ala Arg Glu Met Gly
675 680 685

Glu Ala Asn
690

ES 2 553 421 T3

<211> 102
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 17

tatgaattca tggcgctttt gttgaccacg gtcattgctc tcaactgcct tggcggcttt 60
 gcctccccag gccctgtgcc tccctctaca gccctcaggt ac 102

5

<210> 18
 <211> 101
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 18

gttgatgctc cataccatgc tgccattgca gagcggagcc ttctggttct gggatgatgtt 60
 gaccagctcc tcaatgaggt acctgagggc tgtagaggga g 101

<210> 19
 <211> 100
 <212> ADN

15 <213> Homo sapiens

<400> 19

ctctgggtct tctcgatggc actgcagcct gacacgttga tcagggattc cagggctgca 60
 cagtacatgc cagctgtcag gttgatgctc cataccatgc 100

<210> 20
 <211> 100
 <212> ADN

20 <213> Homo sapiens

<400> 20

cctcgatttt ggtgtctcgg acatgcaagc tggaaaactg cccagctgag accttgtgcg 60
 ggcagaatcc gctcagcatc ctctgggtct tctcgatggc 100

<210> 21

25 <211> 96
 <212> ADN

ES 2 553 421 T3

<213> Homo sapiens
<400> 21
tcggatcctc agttgaaccg tccctcgcga aaaagtttct ttaaagttaa gagcagggtcc 60
tttacaaact gggccacctc gattttggtg tctcgg 96

<210> 22
5 <211> 39
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 22
caacctgaca gctggcatgt actgtgcagc cctggaatc 39

10 <210> 23
<211> 39
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 23
15 gttggactgt cgaccgtaca tgacacgtcg ggaccttag 39
<210> 24
<211> 43
<212> ADN
<213> Homo sapiens

20 <400> 24
atctctagag ccgccacat gcttctcctg gtgacaagcc ttc 43
<210> 25
<211> 34
<212> ADN

25 <213> Homo sapiens
<400> 25
gagggaggca cagggcctgg gatcaggagg aatg 34
<210> 26
<211> 34

30 <212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 26

	cattcctcct gatcccaggc cctgtgcctc cctc	34
	<210> 27	
	<211> 35	
	<212> ADN	
5	<213> Homo sapiens	
	<400> 27	
	gggaccatat ttggactcgt tgaaccgtcc ctcgc	35
	<210> 28	
	<211> 35	
10	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 28	
	gcgaggggacg gttcaacgag tccaaatag gtccc	35
	<210> 29	
15	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 29	
	atgcggccgc tcagcgaggg ggcagg	26
20	<210> 30	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 30	
25	atcgaattcg ccgccacat gggaaacagc tggtacaac	39
	<210> 31	
	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
30	<400> 31	
	gataagctta tcgattcacc acatcctcct tcagtt	36
	<210> 32	
	<211> 43	
	<212> ADN	

<213> Homo sapiens
 <400> 32
 cattgggcta ggcacatcttct tcaggagtaa gaggagcagg ctc 43
 <210> 33
 5 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 33
 gtttcttctt gccccggttg ccacctccgg agcgataggc tgccaag 47
 10 <210> 34
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 34
 15 cttcgcagcc tatcgctccg gaggtggcaa acggggcaga aagaaac 47
 <210> 35
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 35
 gttgcccgcg ctcacagttc acatcctcct tcttcttc 38
 <210> 36
 <211> 1644
 <212> ADN
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 36

ES 2 553 421 T3

atgctgctgc tggtgaccag cctgctgctg tgcgagctgc cccaccccgc ctttctgctg 60
atccctggcc ccgtgcccc tagcaccgcc ctgcgctacc tgatcgagga actggtgaac 120
atcaccaga accagaaagc ccccctgtgc aacggcagca tgggtgtggag catcaacctg 180
accgccgga tgtactgtgc cgccctggaa agcctgatca acgtgagcgg ctgcagcgcc 240
atcgagaaaa cccagcggat gctgtccggc ttctgcccc acaaggtgtc cgccggacag 300
ttcagcagcc tgcacgtgcg ggacaccaag atcgaggtgg cccagttcgt gaaggacctg 360
ctgctgcacc tgaagaagct gttccgggag ggccggttca acgagagcaa gtacggccct 420
ccctgcccc cttgccctgc cccagagttc ctgggcggac ccagcgtgtt cctgttcccc 480
cccaagccca aggacacct gatgatcagc cggaccctg aggtgacctg cgtggtggtg 540
gacgtgagcc aggaagatcc tgaggtccag ttcaattggt acgtggacgg cgtggaagtg 600
cacaacgcca agaccaagcc cagagaggaa cagttcaaca gcacctaccg ggtggtgtct 660
gtgctgaccg tgctgcacca ggactggctg aacggcaaag aatacaagtg caaggtgtcc 720
aacaagggcc tgcccagcag catcgaaaag accatcagca aggccaagg ccagcctcgc 780
gagccccagg tgtacacct gcctccctcc caggaagaga tgaccaagaa ccaggtgtcc 840
ctgacctgcc tgggtgaagg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac 900
ggccagcctg agaacaacta caagaccacc cctcccgtgc tggacagcga cggcagcttc 960
ttcctgtaca gccggctgac cgtggacaag agccggtggc aggaaggcaa cgtctttagc 1020
tgcagcgtga tgcacgaggc cctgcacaac cactacacc agaagagcct gagcctgtcc 1080
ctgggcaaga tgttctgggt gctggtggtg gtgggcgggg tgctggcctg ctacagcctg 1140
ctggtgacag tggccttcat catcttttgg gtgcggagca agcggagcag aggcggccac 1200
agcgactaca tgaacatgac cccagacgg cctggcccc cccggaagca ctaccagccc 1260
tacgccccac ccagggactt tgccgcctac cggtcggcg gagggcgggt gaagttcagc 1320
agaagcgcg acgcccctgc ctaccagcag ggccagaatc agctgtataa cgagctgaac 1380
ctgggcagaa ggggaagagta cgacgtcctg gataagcggg gagggcggga ccctgagatg 1440
ggcggcaagc ctggcgga gaacccccag gaaggcctgt ataacgaact gcagaaagac 1500
aagatggccg aggctacag cgagatcggc atgaaggcg agcggaggcg gggcaagggc 1560
cacgacggcc tgtatcaggg cctgtccacc gccaccaagg atacctacga cgccctgcac 1620
atgcaggccc tgcccccaag gtga 1644

<210> 37

<211> 1761

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 37

ES 2 553 421 T3

atgcttctcc tggtgacaag ctttctgctc tgtgagttac cacacccagc attcctcctg 60
 atcccaggcc ctgtgcctcc ctctacagcc ctcagggagc tcattgagga gctgggtcaac 120
 atcaccaga accagaaggc tccgctctgc aatggcagca tggatggag catcaacctg 180
 acagctggca tgtactgtgc agccctggaa tccctgatca acgtgtcagg ctgcagtgcc 240
 atcgagaaga cccagaggat gctgagcggg ttctgcccgc acaaggtctc agctgggcag 300
 tttccagct tgcattgccc agacacaaa atcgaggtgg cccagtttgt aaaggacctg 360
 ctcttacatt taaagaaact ttttcgagag ggacgggtca acgagtcca atatgggtccc 420
 ccatgcccac catgcccagc acctgagttc ctggggggac catcagtctt cctgttcccc 480
 ccaaaacca aggacactct catgatctcc cggaccctg aggtcacgtg cgtgggtggg 540
 gacgtgagcc aggaagaccg cgaggtccag ttcaactggt acgtggatgg cgtggaggtg 600
 cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagttcaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 660
 gtcctcaccg tctgcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 720
 aaaaaggcc tcccgctctc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 780
 gagccacagc tgtacacctt gccccatcc caggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 840
 ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctacccc agcgacatcg cctgggagtg ggagagcaat 900
 gggcagccg agaacaacta caagaccagc cctcccgtgc tggactccga cggctcctt 960
 ttctctaca gcaggctaac cgtggacaag agcaggtggc aggaggggaa tgtcttctca 1020
 tgctccgtga tgcattgagg tctgcacaac cactacacac agaagagcct ctcccgtct 1080
 ctgggtaaaa tggccctgat tgtgctgggg ggcgtgccg gcctcctgct tttcattggg 1140
 ctaggcatct tcttcaggag taagaggagc aggtcctgc acagtgacta catgaacatg 1200
 actccccgcc gccctgggccc caccgcaag cattaccagc cctatgccc accacgcgac 1260
 ttgcagcct atcgctccgg aggtggcaaa cggggcagaa agaaactcct gtatatatc 1320
 aaacaacct ttatgagacc agtacaact actcaagagg aagatggctg tagctgccga 1380
 tttccagaag aagaagaagg aggatgtgaa ctgggaggtg gcagagtga gttcagcagg 1440
 agcgagacg cccccgcta ccagcagggc cagaaccagc tctataacga gctcaatcta 1500
 ggacgaagag aggagtacga tgttttgac aagagacgtg gccgggacct tgagatgggg 1560
 ggaaagccga gaaggaagaa ccctcaggaa ggctgtaca atgaactgca gaaagataag 1620
 atggcggagg cctacagtga gattgggatg aaaggcgagc gccggagggg caaggggcac 1680

 gatggccttt accaggtct cagtacagcc accaaggaca cctacgacgc ccttcacatg 1740
 caggccctgc cccctcgtg a 1761

<211> 1740

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 38

ES 2 553 421 T3

atgcttctcc tggtgacaag ccttctgctc tgtgagttac cacaccagc attcctcctg 60
 atcccaggcc ctgtgcctcc ctctacagcc ctcaggtacc tcattgagga gctggtcaac 120
 atcaccagca accagaaggc tccgctctgc aatggcagca tggatggag catcaacctg 180
 acagctggca tgtactgtgc agccctggaa tccctgatca acgtgtcagg ctgcagtgcc 240
 atcgagaaga cccagaggat gctgagcgga ttctgcccgc acaaggtctc agctgggcag 300
 tttccagct tgcattgccc agacacaaa atcgaggtgg cccagtttgt aaaggacctg 360
 ctcttacatt taaagaaact ttttcgagag ggacggttca acgagtcca atatggtccc 420
 ccatgcccac catgcccagc acctgagttc ctggggggac catcagtctt cctgttcccc 480
 ccaaaacca aggacactct catgatctcc cggaccctg aggtcacgtg cgtggtggtg 540
 gacgtgagcc aggaagacc cagaggtccag ttcaactggt acgtggatgg cgtggaggtg 600
 cataatgcca agacaaagcc ggggaggag cagttcaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 660
 gtctcaccg tcttgacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 720
 aaaaaggcc tcccgtctc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 780
 gagccacag tgtacacct gcccccctcc caggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 840
 ctgacctgcc tggtaaagg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 900
 gggcagccg agaacaacta caagaccag cctcccgtgc tggactccga cggctcctc 960
 ttctctaca gcaggctaac cgtggacaag agcaggtggc aggggggaa tgtcttctca 1020
 tgctccgtg tgcattgagg tctgcacaac cactacacac agaagagcct ctccctgtcc 1080
 ctaggtaaat tttgggtgct ggtggtggtt ggtggagtcc tggcttgcta tagcttgcta 1140
 gtaacagtgg ctttattat tttctgggtg aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt 1200
 gactacatga acatgactcc ccgcccacc gggcccacc gcaagcatta ccagccctat 1260
 gcccaccac gcgacttcgc agcctatcgc tccagggacc agaggctgcc ccccgatgcc 1320
 cacaagcccc ctgggggagg cagtttccgg acccccctcc aagaggagca ggccgagcc 1380
 cactccacc tggccaagat cagagtgaag ttcagcagga gcgcagacgc ccccgctac 1440
 cagcagggcc agaaccagct ctataacgag ctcaatctag gacgaagaga ggagtacgat 1500
 gttttggaca agagacgtgg ccgggaccct gagatggggg gaaagccgag aaggaagaac 1560
 cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag aaagataaga tggcggaggc ctacagtgag 1620
 attgggatga aaggcgagcg ccggaggggc aaggggcacg atggccttta ccagggtctc 1680
 agtacagcca ccaaggacac ctacgacgcc cttcacatgc aggcctgcc cctcgtctga 1740

<210> 39

<211> 1779

ES 2 553 421 T3

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 39

atgcttctcc tggtgacaag ccttctgctc tgtgagttac cacacccagc attcctcctg	60
atcccaggcc ctgtgcctcc ctctacagcc ctcaggtacc tcattgagga gctgggtcaac	120
atcaccacaga accagaaggg tccgctctgc aatggcagca tggatatggag catcaacctg	180
acagctggca tgtactgtgc agccctggaa tccctgatca acgtgtcagg ctgcagtgcc	240
atcgagaaga cccagaggat gctgagcggg ttctgcccgc acaaggtctc agctgggcag	300
ttttccagct tgcattgtccg agacacacaaa atcgaggtgg cccagtttgt aaaggacctg	360
ctcttacatt taaagaaact ttttcgagag ggacgggtca acgagtccaa atatgggtccc	420
ccatgcccac catgcccagc acctgagttc ctggggggac catcagtctt cctgttcccc	480
ccaaaacca aggacactct catgatctcc cggaccctg aggtcacgtg cgtgggtgtg	540
gacgtgagcc aggaagacct cgaggtccag ttcaactggt acgtggatgg cgtggaggtg	600
cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagttcaaca gcacgtaccg tgtggtcagc	660
gtcctcaccg tcttgcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc	720
aacaaaggcc tcccgtctc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga	780
gagccacagc tgtacacctt gccccatcc caggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc	840
ctgacctgcc tgggtcaaagg ctctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat	900
gggcagccgg agaacaacta caagaccagc cctcccgtgc tggactccga cggctccttc	960
ttcctctaca gcaggctaac cgtggacaag agcaggtggc aggaggggaa tgtcttctca	1020
tgtctcctga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacac agaagagcct ctccctgtcc	1080
ctaggtaaaa tgttttgggt gctggtggtg gttggtggag tcctggcttg ctatagcttg	1140
ctagtaacag tggcctttat tttttctgg gtgaggagta agaggagcag gggcggacac	1200
agtgactaca tgaacatgac tccccgcgc cctgggcca cccgcaagca ttaccagccc	1260
tatgccccac cacgcgactt cgcagcctat cgctccggag gtggcaaacg gggcagaaag	1320
aaactcctgt atatattcaa acaaccattt atgagaccag tacaactac tcaagaggaa	1380

ES 2 553 421 T3

gatggctgta gctgccgatt tccagaagaa gaagaaggag gatgtgaact gggaggtggc	1440
agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc	1500
tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg ttttgacaa gagacgtggc	1560
cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat	1620
gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc	1680
cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggctctca gtacagccac caaggacacc	1740
tacgacgccc ttcacatgca ggcctgccc cctcgctga	1779

<210> 40

<211> 1779

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 40

ES 2 553 421 T3

atgcttctcc tggtgacaag ccttctgctc tgtgagttac cacacccagc attcctcctg 60
 atcccaggcc ctgtgcctcc ctctacagcc ctcaggtacc tcattgagga gctggtcaac 120
 atcaccaga accagaaggc tccgctctgc aatggcagca tggatggag catcaacctg 180
 acagctggca tgtactgtgc agccctggaa tccctgatca acgtgtcagg ctgcagtgcc 240
 atcgagaaga cccagaggat gctgagcggg ttctgcccgc acaaggtctc agctgggcag 300
 ttttcagct tgcattgtcc agacacaaa atcgaggtgg cccagtttgt aaaggacctg 360
 ctcttacatt taaagaaact ttttcgagag ggacgggtca acgagtccaa atatggtccc 420
 ccatgcccac catgcccagc acctgagttc ctggggggac catcagtctt cctgttcccc 480
 ccaaaacca aggacactct catgatctcc cggaccctg aggtcacgtg cgtggtggtg 540
 gaggtgagcc aggaagacct cgaggtccag ttcaactggt acgtggatgg cgtggaggtg 600
 cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagttcaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 660
 gtctcaccg tctgcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 720
 aaaaaggcc tcccgctctc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 780
 gagccacag tgtacacct gccccatcc caggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 840
 ctgacctgcc tggtcaaagg cttctacccc agcgacatcg cctgggagtg ggagagcaat 900
 gggcagccgg agaacaacta caagaccag cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 960
 ttctctaca gcaggtaac cgtggacaag agcaggtggc aggggggaa tgtcttctca 1020
 tgctccgtga tgcattgagg tctgcacaac cactacacac agaagagcct ctccctgtcc 1080
 ctaggtaaaa tgttttgggt gctggtgggt gttggtggag tcttggtctg ctatagcttg 1140
 ctagtaacag tggcctttat tttttctgg gtgaggagta agaggagcag gggcggacac 1200

 agtgactaca tgaacatgac tccccgcgc cctgggcca cccgcaagca ttaccagccc 1260
 tatgccccac cacgcgactt cgcagccgga ggtggcggag gtggcaaacg gggcagaaag 1320
 aaactcctgt atatattcaa acaaccattt atgagaccag taaaaactac tcaagaggaa 1380
 gatggctgta gctgccgatt tccagaagaa gaagaaggag gatgtgaact gggaggtggc 1440
 agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc 1500
 tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg ttttgacaa gagacgtggc 1560
 cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctgaggaag cctgtacaat 1620
 gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 1680
 cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc 1740
 tacgacgcc ttcacatgca ggccctgccc cctcgtgta 1779

<210> 41

<211> 544

ES 2 553 421 T3

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 41

```

ggatctgcga tcgctccggt gcccgtcagt gggcagagcg cacatcgccc acagtccccg      60
agaagttggg gggagggggtc ggcaattgaa ccggtgccta gagaaggtgg cgcggggtaa      120
actgggaaag tgatgtcgtg tactggctcc gcctttttcc cgaggggtggg ggagaaccgt      180
atataagtgc agtagtcgcc gtgaacgttc tttttcgcaa cgggtttgcc gccagaacac      240
agctgaagct tcgagggggt cgcattctctc cttcacgcgc ccgccgccct acctgaggcc      300
gccatccacg ccggttgagt cgcgttctgc cgcctcccgc ctgtggtgcc tcctgaactg      360
cgtccgccgt ctaggtaagt ttaaagetca ggtcgagacc gggcctttgt ccggcgctcc      420
cttgagcct acctagactc agccggctct ccacgcttg cctgaccctg cttgctcaac      480
tctacgtctt tgtttcgttt tctgttctgc gccgttacag atccaagctg tgaccggcgc      540
ctac                                                                                   544

```

5 <210> 42

<211> 1494

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 42

```

atgcttctcc tggtgacaag ctttctgctc tgtgagttac cacaccagc attcctcctg      60
atcccaggcc ctgtgcctcc ctctacagcc ctcaggtagc tcattgagga gctgggtcaac      120
atcaccaga accagaaggc tccgctctgc aatggcagca tggtagggag catcaacctg      180
acagctggca tgtactgtgc agccctggaa tcctgatca acgtgtcagg ctgcagtgcc      240

```

10

ES 2 553 421 T3

atcgagaaga cccagaggat gctgagcgga ttctgcccgc acaaggtctc agctgggcag 300
 ttttccagct tgcattgtccg agacacccaaa atcgaggtgg cccagtttgt aaaggacctg 360
 ctcttacatt taaagaaact ttttcgagag ggacgggtca acgagtccaa atatgggtccc 420
 ccatgcccac catgcccagc acctgagttc ctgggggggac catcagttctt cctgttcccc 480
 ccaaaaccca aggacactct catgatctcc cggaccctcg aggtcacgtg cgtggtggtg 540
 gacgtgagcc aggaagacct cgaggtccag ttcaactggt acgtggatgg cgtggaggtg 600
 cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagttcaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 660
 gtctcaccg tctgaccca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 720
 aacaaaggcc tcccgtctc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 780
 gagccacagg tgtacacctt gccccatcc caggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 840
 ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 900
 gggcagccgg agaacaacta caagaccag cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 960
 ttctctaca gcaggctaac cgtggacaag agcaggtggc aggaggggaa tgtcttctca 1020
 tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacac agaagagcct ctcccctgtcc 1080
 ctaggtaaaa tggccctgat tgtgctgggg ggcgtcgccg gcctcctgct tttcattggg 1140
 ctaggcatct tcttcagagt gaagttcagc aggagcgcag acgccccgc gtaccagcag 1200
 ggccagaacc agctctataa cgagctcaat ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg 1260
 gacaagagac gtggccggga ccctgagatg gggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag 1320
 gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggctacag tgagattggg 1380
 atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg cacgatggcc tttaccaggg tctcagtaca 1440
 gccaccaagg acacctacga cgcccttcac atgcaggccc tgccccctcg ctga 1494

<210> 43

<211> 268

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 43

ES 2 553 421 T3

gacatgataa gatacattga tgagtttggga caaaccacaa ctagaatgca gtgaaaaaaaa 60
 tgctttatatt gtgaaatttg tgatgctatt gctttatttg tgaattttgt gatgctattg 120
 ctttattttgt aaccattata agctgcaata aacaagttaa caacaacaat tgcattcatt 180
 ttatgtttca ggttcagggg gaggtgtggg aggtttttta aagcaagtaa aacctctaca 240
 aatgtggtag atccatttaa atgttagc 268

<210> 44

<211> 748

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 44

gaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct 60
 ggcgtttttc cataggetcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca 120
 gaggtggcga aaccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct 180
 cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgct ttctcccttc 240
 ggaagcgtg gcgctttctc aatgctcacg ctgtaggtat ctgagttcgg ttaggtcgt 300
 tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc cccggttcag cccgaccgct gcgccttacc 360
 cggtaactat cgtcttgagt ccaaccggg aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc 420
 cactggtaac aggattagca gagcgaggta ttaggtcggg gctacagagt tcttgaagtg 480
 gtggcctaac tacggctaca ctagaagaac agtatattgg atctgcgctc tgctgaagcc 540
 agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag 600
 cgggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaggat ctcaagaaga 660
 tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat 720
 tttggtcatg gctagttaat taagctgc 748

<210> 45

<211> 187

10 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 45

ES 2 553 421 T3

aataaacaat cattatthttc attggatctg tgtgthtggth tthtghtgtgg gcttgthggga 60
 gthgggagggcc agaatgactc caagagctac aggaagggcag gtcagagacc ccactggaca 120
 aacagtggtt ggactctgca ccataacaca caatcaacag gggagtgagc tggatcgagc 180
 tagagtc 187

<210> 46

<211> 811

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 46

cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt 60
 gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactthcc attgacgtca 120
 atgggtggag tathttacggg aaactgcccc cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc 180
 aagtacggcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcttggcatt atgcccagta 240

 catgacctta tgggactthc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac 300
 catgggtgatg cggthtttggc agtacatcaa tgggcttggg tagcggthtg actcacgggg 360
 atthccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagthtg thttggcacc aaaatcaacg 420
 ggactthcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatggggc gtaggcgtgt 480
 acggtgggag gtctatataa gcagagctcg thtagtgaac cgtcagatcg cctggagacg 540
 ccatccacgc tgtthttgacc tccatagaag acaccgggac cgatccagcc tccgcggccg 600
 ggaacgggtgc attggaacgc ggattccccg tgccaagagt gacgtaagta ccgcctatag 660
 agtctatagg cccacctagt tgtgaccggc gcctagtgtt gacaattaat catcggcata 720
 gtataatacg actcaactata ggagggccac catgtcgact actaaccttc thctctthcc 780
 tacagctgag atcaccggta ggagggccat c 811

<210> 47

<211> 2076

10 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 47

ES 2 553 421 T3

atgaaaaagc ctgaactcac cgcgacgtct gtcgcgaagt ttctgatcga aaagttcgac	60
agcgtctccg acctgatgca gctctcggag ggcgaagaat ctcgtgcttt cagcttcgat	120
gtaggagggc gtggatatgt cctgcgggta aatagctgcg ccgatggttt ctacaaagat	180
cgttatgttt atcggcactt tgcacccgcc gcgctcccga ttccggaagt gcttgacatt	240
ggggaattca gcgagagcct gacctattgc atctcccgcc gtgcacaggg tgtcacgttg	300
caagacctgc ctgaaaccga actgcccgct gttctgcaac ccgtcgcgga gctcatggat	360
gcgatcgctg cggccgatct tagccagacg agcgggttcg gccatttcgg accgcaagga	420
atcggtcaat aactacatg gcgtgatttc atatgcgcga ttgctgatcc ccatgtgtat	480
cactggcaaa ctgtgatgga cgacaccgtc agtgcgtccg tcgctcaggg tctcgatgag	540
ctgatgcttt gggccgagga ctgccccgaa gtccggcacc tcgtgcacgc ggatttcggc	600
tccaacaatg tcttgacgga caatggccgc ataacagcgg tcattgactg gagcgaggcg	660
atgttcgggg attccaata cgaggtcgcc aacatcttct tctggaggcc gtggttggct	720
tgtatggagc agcagacgcg ctacttcgag cggaggcatc cggagcttgc aggatcgccg	780
cggctccggg cgtatatgct ccgcattggt cttgaccaac tctatcagag cttggttgac	840
ggcaatttcg atgatgcagc ttgggcgcag ggtcgatgcg acgcaatcgt ccgatccgga	900
gccgggactg tcgggcgtac acaaatcgcc cgcagaagcg cggccgtctg gaccgatggc	960
tgtgtagaag tcgcgtctgc gttcgaccag gctgcgcggt ctgcggcca tagcaaccga	1020

ES 2 553 421 T3

cgtacggcgt tgcgccctcg ccggcagcaa gaagccacgg aagtccgccc ggagcagaaa 1080
 atgcccacgc tactgcgggt ttatatagac ggtccccacg ggatggggaa aaccaccacc 1140
 acgcaactgc tggtgccctt gggttcgcgc gacgatatcg tctacgtacc cgagccgatg 1200
 acttactggc gggtgctggg ggcttccgag acaatcgcga acatctacac cacacaacac 1260
 cgcctcgacc agggtgagat atcggccggg gacgcggcgg tggtaatgac aagcgcaccag 1320
 ataacaatgg gcatgcctta tgccgtgacc gacgccgttc tggctcctca tatcgggggg 1380
 gaggctggga gctcacatgc cccgcccccg gccctcacc tcactcttca ccccatccc 1440
 atcggccgcc tcctgtgcta cccggccgcg cggtacctta tgggcagcat gacccccag 1500
 gccgtgctgg cgttcgtggc cctcatcccg ccgacctgc ccggcaccaa catcgtgctt 1560
 ggggcccttc cggaggacag acacatcgac cgctggcca aacgccagcg cccggcgag 1620
 cggctggacc tggctatgct ggctgcgatt cgcgcgctt acgggctact tgccaatacg 1680
 gtgcggtatc tgcaagtgcg cgggtcgtgg cgggaggact ggggacagct ttcggggacg 1740
 gccgtgccgc ccagggtgc cgagccccag agcaacgcgg gccacgacc ccatatcggg 1800
 gacacgttat ttaccctgtt tcgggcccc gagttgctgg cccccaacgg cgacctgtat 1860
 aacgtgtttg cctgggcctt ggacgtcttg gccaaacgcc tccgttccat gcacgtcttt 1920
 atcctggatt acgaccaatc gccgcgccgc tgccgggacg ccctgctgca acttacctcc 1980
 gggatggtcc agaccacgt caccacccc ggctccatac cgacgatatg cgacctggcg 2040
 cgcacgtttg cccgggagat gggggaggct aactga 2076

<210> 48

<211> 299

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 48

gtcgagaatt cgctagaggg ccctattcta tagtgtcacc taaatgctag agctcgtgta 60
 tcagcctcga ctgtgccttc tagttgccag ccatctgttg tttgccctc ccccgctcct 120
 tccttgacc tggaaaggct cactcccact gtcctttcct aataaaatga ggaaattgca 180
 tcgcattgtc tgagtaggtg tcattctatt ctgggggggtg ggggggggca ggacagcaag 240
 ggggaggatt ggaagacaa tagcaggcat gcgcagggcc caattgctcg agcggccgc 299

<210> 49

<211> 75

10 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

ES 2 553 421 T3

<220>

<223> oliconucleótido con homología al gen de la enfermedad de glosopeda

<400> 49

tctagaggag catgccagct gttgaatttt gaccttctta agcttgcggg agacgtcgag 60

tccaaccctg ggccc 75

5 <210> 50

<211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 50

10 caagaatccc aaactcacca g 21

<210> 51

<211> 23

<212> ADN

<213> Homo sapiens

15 <400> 51

cgttgatatt gctgattaag tcc 23

<210> 52

<211> 24

<212> ADN

20 <213> Homo sapiens

<400> 52

atcccagtaa tgggtgcct gcct 24

<210> 53

<211> 24

25 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 53

tcttgcttag gttggctgcc tagt 24

Reivindicaciones

1. Un receptor antígeno quimérico (CAR) que está codificada por el ADN de la SEQ ID NO: 37.
2. Un linfocito T asilado que expresa el CAR de la reivindicación 1.
- 5 3. Un linfocito T que expresa el CAR de la reivindicación 1 para uso en inmunoterapia del cáncer.
4. El linfocito T de la reivindicación 2 para uso en inmunoterapia del cáncer.
5. El linfocito T de la reivindicación 3 o de la reivindicación 4 en donde dicho cáncer es seleccionado del grupo que consiste de glioblastoma, meduloblastoma, cáncer de seno, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, cáncer de ovario, sarcoma de Kaposi, leucemia mielogenosa aguda, y enfermedades malignas de linaje B.

10

FIG. 1

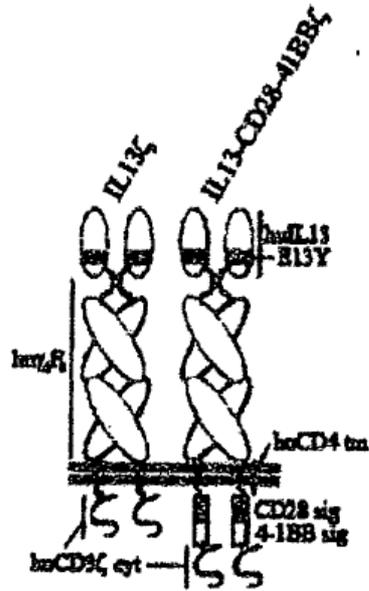


FIG. 2

```

IL13P1
-----
      M A L L L T T V I A L T C L G G F
1  TATGAATTCA TGGCGCTTTT GTTGACCACG GTCATTGCTC TCACTTGCTT TGGCGGCTTT
   ATACTTAAGT ACCGGGAAAA CAACTGGTGC CAGTAACGAG AGTGAACGGA ACCGCCGAAA
      IL13P1
----->
<-----
      IL13P2
61  A S P G P V P P S T A L R Y L I E E L V
   GCCTCCCCAG GCCCTGTGCC TCCCTCTACA GCCCTCAGGT ACCTCATTGA GGAGCTGGTC
   CGGAGGGGTC CGGGACACGG AGGGAGATGT CGGGAGTCCA TGGAGTAACT CCTCGACCAG

      N I T Q N Q K A P L C N G S M V W S I N
121 AACATCACCC AGAACCAGAA GGCTCCGCTC TGCAATGGCA GCATGGTATG GACCATCAAC
   TTGTAGTGGG TCTTGGTCTT CCGAGGGGAG ACGTTACCGT CGTACCATAC CTCGTAGTTG
-----
      IL13P2
<-----
      IL13P3
181 L T A G M Y C A A L E S L I N V S G C S
   CTGACAGCTG GCATGTACTG TGCAGCCCTG GAATCCCTGA TCAACGTGTC AGGCTGCAGT
   GACTGTGCAG CGTACATGAC ACGTCGGGAC CTTAGGGACT AGTTGCACAG TCCGACGTCA
-----
      IL13P3
241 A I E K T Q R M L S G F C P H K V S A G
   GCCATCGAGA AGACCCAGAG GATGCTGAGC GGATTCTGCC CGCACAAGGT CTCAGCTGGG
   CGGTAGCTCT TCTGGGTCTC CTACGACTCG CCTAAGACGG GCGTGTTCOA GAGTCGACCC
-----
      IL13P3
<-----
      IL13P4
301 Q F S S L H V R D T K I E V A Q F V K D
   CAGTTTTCCA GCTTGCATGT CCGAGACACC AAAATCGAGG TGGCCAGTT TGTAAGGAC
   GTCAAAAGGT CGAACGTACA GGCTCTGTGG TTTTAGCTCC ACCGGGTCAA ACATTCCTG
-----
      IL13P4
<-----
      IL13P5
-----
      IL13P5
361 L L L H L K K L F R E G R F N * (SEQ ID NO:1)
   CTGCTCTTAC ATTTAAGAA ACTTTTTCGC GAGGGACGGT TCAACTGAGG ATCCGA (SEQ ID NO:2)
   GACGAGAATG TAAATTTCTT TGAAAAAGCG CTCCTGCCA AGTTGACTCC TAGGCT (SEQ ID NO:3)

```

FIG. 3A

				M	L	L	L	V	T	S	L	L	L	C	E	L	P				
1	ATCTCTAGAG	CCGCCACCAT	GCTTCTCCTG	GTGACAAGCC	TTCTGCTCTG	TGAGTTACCA															
	TAGAGATCTC	GGCGGTGGTA	CGAAGAGGAC	CACTGTTCGG	AAGACGAGAC	ACTCAATGGT															
		H	P	A	F	L	L	I	P	G	P	V	P	P	S	T	A	L	R	Y	L
61	CACCCAGCAT	TCCTCCTGAT	CCCAGGCCCT	GTGCCTCCCT	CTACAGCCCT	CAGGTACCTC															
	GTGGGTCGTA	AGGAGGACTA	GGGTCCGGGA	CACGGAGGGA	GATGTCGGGA	GTCCATGGAG															
		I	E	E	L	V	N	I	T	Q	N	Q	K	A	P	L	C	N	G	S	M
121	ATTGAGGAGC	TGGTCAACAT	CACCCAGAAC	CAGAAGGCTC	CGCTCTGCAA	TGGCAGCATG															
	TAACTCCTCG	ACCAGTTGTA	GTGGGTCTTG	GTCTTCCGAG	GCGAGACGTT	ACCGTCGTAC															
		V	W	S	I	N	L	T	A	G	M	Y	C	A	A	L	E	S	L	I	N
181	GTATGGAGCA	TCAACCTGAC	AGCTGGCATG	TACTGTGCAG	CCCTGGAATC	CCTGATCAAC															
	CATACCTCGT	AGTTGGACTG	TCGACCGTAC	ATGACACGTC	GGGACCTTAG	GGACTAGTTG															
		V	S	G	C	S	A	I	E	K	T	Q	R	M	L	S	G	F	C	P	H
241	GTGTCAGGCT	GCAGTGCCAT	CGAGAAGACC	CAGAGGATGC	TGAGCGGATT	CTGCCCGCAC															
	CACAGTCCGA	CGTCACGGTA	GCTCTTCTGG	GTCTCCTACG	ACTCGCCTAA	GACGGGCGTG															
		K	V	S	A	G	Q	F	S	S	L	H	V	R	D	T	K	I	E	V	A
301	AAGGTCTCAG	CTGGGCAGTT	TTCCAGCTTG	CATGTCCGAG	ACACCAAAT	CGAGGTGGCC															
	TTCCAGAGTC	GACCCGTCAA	AAGGTGGAAC	GTACAGGCTC	TGTGGTTTTA	GCTCCACCGG															
		Q	F	V	K	D	L	L	L	H	L	K	K	L	F	R	E	G	R	F	N
361	CAGTTTGTAA	AGGACCTGCT	CTTACATTTA	AAGAACTTTT	TTGCGAGGGG	ACGGTTCAAC															
	GTCAAACATT	TCCTGGACGA	GAATGTAAT	TTCTTTGAAA	AAGCGCTCC	TGCCAAGTTG															
		E	S	K	Y	G	P	P	C	P	P	C	P	A	P	E	F	L	G	G	P
421	GAGTCCAAAT	ATGGTCCCCC	ATGCCCACCA	TGCCCAGCAC	CTGAGTTCCT	GGGGGGACCA															
	CTCAGGTTTA	TACCAGGGGG	TACGGGTGGT	ACGGGTCGTG	GACTCAAGGA	CCCCCTGGT															
		S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E
481	TCAGTCTTCC	TGTTCCCCCC	AAAACCCAAG	GACACTCTCA	TGATCTCCCG	GACCCCTGAG															
	AGTCAGAAGG	ACAAGGGGGG	TTTTGGGTTC	CTGTGAGAGT	ACTAGAGGGC	CTGGGGACTC															
		V	T	C	V	V	V	D	V	S	Q	E	D	P	E	V	Q	F	N	W	Y
541	GTCACGTGCG	TGGTGGTGGA	CGTGAGCCAG	GAAGACCCCG	AGGTCCAGTT	CAACTGGTAC															
	CAGTGCACGC	ACCACCACCT	GCACTCGGTC	CTTCTGGGGC	TCCAGGTCAA	GTTGACCATG															
		V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	F	N	S
601	GTGGATGGCG	TGGAGGTGCA	TAATGCCAAG	ACAAAGCCGC	GGGAGGAGCA	GTTCAACAGC															
	CACCTACCGC	ACCTCCAGGT	ATTACGGTTC	TGTTTCGGCG	CCCTCCTCGT	CAAGTTGTCC															

FIG. 3B

T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E
 661 ACGTACCGTG TGGTCAGCGT CCTCACCGTC CTGCACCAGG ACTGGCTGAA CGGCAAGGAG
 TGCATGGCAC ACCAGTCGCA GGAGTGGCAG GACGTGGTCC TGACCGACTT GCCGTTCCCTC

Y K C K V S N K G L P S S I E K T I S K
 721 TACAAGTGCA AGGTCTCCAA CAAAGGCCTC CCGTCCTCCA TCGAGAAAAC CATCTCCAAA
 ATGTTACCGT TCCAGAGGTT GTTCCGGAG GGCAGGAGGT AGCTCTTTTG GTAGAGGTTT

A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M
 781 GCCAAAGGGC AGCCCGAGA GCCACAGGTG TACACCCTGC CCCCATCCCA GGAGGAGATG
 CGGTTCCCG TCGGGGCTCT CGGTGTCCAC ATGTGGGACG GGGGTAGGTT CCTCCTCTAC

T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A
 841 ACCAAGAACC AGGTGAGCCT GACCTGCCTG GTCAAAGGCT TCTACCCCG AGCATCGCC
 TGTTCTTGG TCCAGTCGGA CTGGACGGAC CAGTTTCCGA AGATGGGGTC GCTGTAGCGG

V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L
 901 GTGGAGTGGG AGAGCAATGG GCAGCCGGAG ACAAAC TACA AGACCACGCC TCCCGTGCCTG
 CACCTCACCC TCTCGTTACC CGTCGGCCTC TTGTTGATGT TCTGGTGGG AGGGCACGAC

D S D G S F F L Y S R L T V D K S R W Q
 961 GACTCCGACG GCTCCTTCTT CCTCTACAGC AGGCTAACCG TGGACAAGAG CAGGTGGCAG
 CTGAGGCTGC CGAGGAAGAA GGAGATGTGC TCCGATTGGC ACCTGTCTCT GTCCACCGTC

E G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q
 1021 GAGGGGAATG TCTTCTCATG CTCCGTGATG CATGAGGCTC TGCACAACCA CTACACACAG
 CTCCTTAC AGAAGAGTAC GAGGCACTAC GTACTCCGAG ACGTSTTGGT GATGTGTGTC

K S L S L S L G K M A L I V L G G V A G
 1081 AAGAGCCTCT CCCTGTCTCT GGGTAAATG GCCCTGATTG TGCTGGGGGG CGTCGCCGGC
 TTCTCGGAGA GGGACAGAGA CCCATTTTAC CGGGACTAAC ACGACCCCC CGAGCGGGCC

L L L F I G L G I F F R V K F S R S A D
 1141 CTCCTGCTTT TCATTGGGCT AGGCATCTTC TTCAGAGTGA AGTTCAGCAG GAGCGCAGAC
 GAGGACGAAA AGTAACCCGA TCCGTAGAAG AAGTCTCACT TCAAGTCGTC CTCGCGTCTG

A P A Y Q Q G Q N Q L Y N E L N L G R R
 1201 GCCCCGCGT ACCAGCAGGG CCAGAACCAG CTCTATAACG AGCTCAATCT AGGACGAGA
 CGGGGGCGCA TGGTCGTCCC GGTCTGGTC GAGATATTGC TCGAGTTAGA TCCTGCTTCT

E E Y D V L D K R R G R D P E M G G K P
 1261 GAGGAGTACG ATGTTTGGG CAAGAGACGT GGCCGGGACC CTGAGATGGG GGGAAAGCCG
 CTCCTCATGC TACAAAACCT GTTCTCTGCA CCGGCCCTGG GACTCTACCC CCCTTTCGGC

FIG. 3C

```

      R R K N P Q E G L Y N E L Q K D K M A E
1321 AGAAGGAAGA ACCCTCAGGA AGGCCTGTAC AATGAACTGC AGAAAGATAA GATGGCGGAG
      TCTTCCTTCT TGGGAGTCCT TCCGGACATG TFACTTGACG TCTTTCTATT CTACCGCCTC

      A Y S E I G M K G E R R R G K G H D G L
1381 GCCTACAGTG AGATTGGGAT GAAAGGCGAG CGCCGGAGGG GCAAGGGGCA CGATGGCCTT
      CGGATGTCAC TCTAACCTA CTTTCCGCTC GCGGCCTCCC CGTTCCCCGT GCTACCGGAA

      Y Q G L S T A T K D T Y D A L H M Q A L
1441 TACCAGGGTC TCAGTACAGC CACCAAGGAC ACCTACGACG CCCTTCACAT GCAGGCCCTG
      ATGGTCCCAG AGTCATGTCG GTGGTTCTTG TGGATGCTGC GGAAGTGTA CGTCCGGGAC

      P P R * (SEQ ID NO:4)
1501 CCCCCTCGCT AAGCGGCCGC AT (SEQ ID NO:5)
      GGGGAGCGA TTCGCCGCG TA (SEQ ID NO:6)

```

péptido de señalización alfa GM-CSFR (nucleótidos 18-84; SEQ ID NO:7)
 IL13 (EmY) (nucleótidos 85-420; SEQ ID NO:8)
 IgG4 (SmP) (nucleótidos 421-1107; SEQ ID NO:9)
 CD4tm (nucleótidos 1108-1173; SEQ ID NO:10)
 CD3 zeta (nucleótidos 1174-1512; SEQ ID NO:11)

FIG. 4

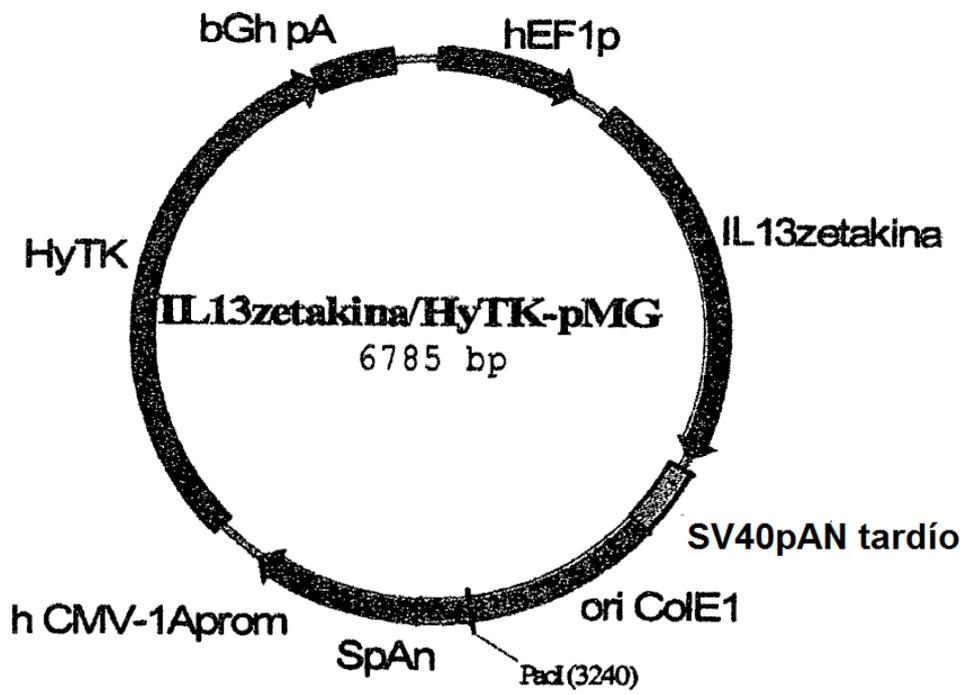


FIG. 5A

(hEF1p-)

```

1   TCGAAGGATC TGCGATCGCT CCGGTGCCCC TCAGTGGGCA GAGCGCACAT CGCCCACAGT
    AGCTTCCTAG ACGCTAGCGA GGCCACGGGC AGTCACCCGT CTCGCGTGTA GCGGGTGTCA

61  CCCCAGAGAAG TTGGGGGGAG GGGTCGGCAA TTGAACCGGT GCCTAGAGAA GGTGGCGCGG
    GGGGCTCTTC AACCCCCCTC CCCAGCCGTT AACTTGGCCA CGGATCTCTT CCACCGCGCC

121 GGTAAACTGG GAAAGTGATG TCGTGTACTG GCTCCGCTT TTTCCGAGG GTGGGGGAGA
    CCATTGACC CTTTCACTAC AGCACATGAC CGAGGCGGAA AAAGGGCTCC CACCCCTCT

181 ACCGTATATA AGTGCAGTAG TCGCCGTGAA CGTTCTTTTT CGCAACGGGT TTGCCGCCAG
    TGGCATATAT TCACGTCATC AGCGGCACCT GCAAGAAAAA GCGTTGCCCA AACGGCGGTC

241 AACACAGCTG AAGCTTCGAG GGGCTCGCAT CTCTCCTTCA CGCGCCCGCC GCCCTACCTG
    TTGTGTCGAC TTCGAAGCTC CCCGAGCGTA GAGAGGAAGT GCGCGGGCGG CGGGATGGAC

301 AGGCCGCCAT CCAGCCGGT TGAGTCGCGT TCTGCCGCT CCCGCCTGTG GTGCCCTCTG
    TCCGGCGGTA GGTGCGGCCA ACTCAGCGCA AGACGCGGGA GGGCGGACAC CACGGAGGAC

361 AACTGCGTCC GCCGTCTAGG TAAGTTTAAA GCTCAGGTCG AGACCGGGCC TTTGTCCGGC
    TTGACGCAGG CGGCAGATCC ATTCAAATTT CGAGTCCAGC TCTGGCCCGG AAACAGGCCG

421 GCTCCCTTGG AGCCTACCTA GACTCAGCCG GCTCTCCACG CTTTGCCTGA CCCTGCTTGC
    CGAGGGAACC TCGGATGGAT CTGAGTCGGC CGAGAGGTGC GAAACGGACT GGGACGAACC

481 TCAACTCTAC GTCTTTGTTT CGTTTTCTGT TCTGCGCCGT TACAGATCCA AGCTGTGACC
    AGTTGAGATG CAGAAACAAA GCAAAAGACA AGACGCGGCA ATGTCTAGGT TCGACACTGG

541 GCGCCTACG TAAGTGATAT CTA TAGATT TATCAAAAAG AGTGTGACT TGTGAGCGCT
    CCGCGGATGC ATCACTATA GATGATCTAA ATAGTTTTTC TCACA ACTGA AACTCGCGA

601 CACAATTGAT ACGGATTCAT CGAGAGGGAC ACGTCGACTA CTAACCTTCT TCTCTTCTCT
    GTGTTA ACTA TGCTAAGTA GCTCTCCCTG TGCAGCTGAT GATTGGAAGA AGAGAAAGGA

```

FIG. 5B

(IL13zetakina-)

M L L L V T S L L L

661 ACAGCTGAGA TCACCCTAGA GCCGCCACCA TGCTTCTCCT GGTGACAAGC CTTCTGCTCT
 TGTCGACTCT AGTGGGATCT CGGCGGTGGT ACGAAGAGGA CCACTGTTCG GAAGACGAGA

C E L P H P A F L L I P G P V P P S T A

721 GTGAGTTACC ACACCCAGCA TTCCTCCTGA TCCCAGGCC TGTGCCTCCC TCTACAGCCC
 CACTCAATGG TGTGGGTCGT AAGGAGGACT AGGGTCCGGG ACACGGAGGG AGATGTCCGG

L R Y L I E E L V N I T Q N Q K A P L C

781 TCAGGTACCT CATTGAGGAG CTGGTCAACA TCACCCAGAA CCAGAAGGCT CCGCTCTGCA
 AGTCCATGGA GTAACCTCTC GACCAGTTGT AGTGGGTCTT GGTCTTCCGA GGCAGACGCT

N G S M V W S I N L T A G M Y C A A L E

841 ATGGCAGCAT GGTATGGAGC ATCAACCTGA CAGCTGGCAT GTACTGTGCA GCCCTGGAAT
 TACCGTCGTA CCATACCTCG TAGTTGGACT GTCGACCGTA CATGACACGT CGGGACCTTA

S L I N V S G C S A I E K T Q R M L S G

901 CCCTGATCAA CGTGTCAAGC TGCAGTGCCA TCGAGAAGAC CCAGAGGATG CTGAGCGGAT
 GGGACTAGTT GCACAGTCCG ACGTCACGGT AGCTCTTCTG GGTCTCTAC GACTCGCCTA

F C P H K V S A G Q F S S L H V R D T K

961 TCTGCCCGCA CAAGGTCTCA GCTGGGCAGT TTTCCAGCTT GCATGTCCGA GACACCAAAA
 AGACGGGCGT GTTCCAGAGT CGACCCGTC A AAGGTCGAA CGTACAGGCT CTGTGGTTTT

I E V A Q F V K D L L L H L K K L F R E

1021 TCGAGGTGGC CCAGTTTGTA AAGGACCTGC TCTTACATTT AAAGAACTT TTTCCGGAGG
 AGCTCCACCG GGTCAAACAT TTCCTGGACG AGAATGTAAA TTTCTTTGAA AAAGCGCTCC

G R F N E S K Y G P P C P P C P A P E F

1081 GACGGTTCAA CGAGTCCAAA TATGGTCCCC CATGCCACC ATGCCAGCA CCTGAGTTCC
 CTGCCAAGTT GCTCAGGTTT ATACCAGGGG GTACGGGTGG TACGGGTCGT GGAICTAAGG

L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S

1141 TGGGGGACC ATCAGTCTTC CTGTTCCCC CAAAACCCAA GGACACTCTC ATGATCTCCC
 ACCCCCTGG TAGTCAGAAG GACAAGGGGG GTTTTGGGT CCTGTGAGAG TACTAGAGGG

FIG. 5C

R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q
 1201 GGACCCCTGA GGTACCGTGC GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA GGAAGACCCC GAGGTCCAGT
 CCTGGGGACT CCAGTGCACG CACCACCACC TGCCTCGGT CCTTCTGGGG CTCCAGGTCA

F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E
 1261 TCAACTGGTA CGTGGATGGC GTGGAGGTGC ATAATGCCAA GACAAAGCCG CGGGAGGAGC
 AGTTGACCAT GCACCTACCG CACCTCCACG TATTACGGTT CTGTTTCGGC GCCCTCCTCG

Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L
 1321 AGTTCAACAG CACGTACCGT GTGGTCAGCG TCCTCACCGT CCTGCACCAG GACTGGCTGA
 TCAAGTTGTC GTGCATGGCA CACCAGTCGG AGGAGTGGCA GGACGTGGTC CTGACCAGCT

N G K E Y K C K V S N K G L P S S I E K
 1381 ACGGCAAGGA GTACAAGTGC AAGGTCTCCA ACAAAGGCCT CCCGTCTCC ATCGAGAAAA
 TGCCGTTCCCT CATGTTACCG TTCCAGAGGT TGTTTCCGGA GGGCAGGAGG TAGTCTTTT

T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S
 1441 CCATCTCCAA AGCCAAAGGG CAGCCCCGAG AGCCACAGGT GTACACCCTG CCCCCATCCC
 GGTAGAGGTT TCGGTTTCCC GTCGGGGCTC TCGGTGTCCA CATGTGGGAC GGGGGTAGGG

Q E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P
 1501 AGGAGGAGAT GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC TTCTACCCCA
 TCCTCCTCTA CTGGTTCTTG GTCCAGTCGG ACTGGACGGA CCAGTTTCCG AAGATGGGGT

S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T
 1561 GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACTAC AAGACCACGC
 CGCTGTAGCG GCACCTCACC CTCTCGTTAC CCGTCGGCCT CTTGTTGATG TTCTGGTGGC

P P V L D S D G S F F L Y S R L T V D K
 1621 CTCCCCTGCT GGACTCCGAC GGCTCCTTCT TCCTCTACAG CAGGCTAACC GTGGACAAGA
 GAGGGCACGA CCTGAGGCTG CCGAGGAAGA AGGAGATGTC GTCCGATTGG CACCTGTTCT

S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N
 1681 GCAGGTGGCA GGAGGGGAAT GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC
 CGTCCACCGT CCTCCCCTTA CAGAAGAGTA CGAGGCACTA CGTACTCCGA GACGTGTTGG

FIG. 5D

H Y T Q K S L S L S L G K M A L I V L G
 1741 ACTACACACA GAAGAGCCTC TCCCTGTCCC TAGGTAAAAT GGCCTGATT GTGCTGGGGG
 TGATGTGTGT CTTCTCGGAG AGGGACAGGG ATCCATTTTA CCGGGACTAA CACGACCCCC

 G V A G L L L F I G L G I F F R V K F S
 1801 GCGTCGCCGG CCTCCTGCTT TTCATTGGGC TAGGCATCTT CTCAGAGTG AAGTTCAGCA
 CGCAGCGGCC GGAGGACGAA AAGTAACCCG ATCCGTAGAA GAAGTCTCAC TTCAAGTCGT

 R S A D A P A Y Q Q G Q N Q L Y N E L N
 1861 GGAGCGCAGA CGCCCCGCG TACCAGCAGG GCCAGAACCA GCTCTATAAC GAGCTCAATC
 CCTCGCGTCT GCGGGGGCGC ATGGTCGTCC CGGTCTTGGT CGAGATATG CTCGAGTTAG

 L G R R E E Y D V L D K R R G R D P E M
 1921 TAGGACGAAG AGAGGAGTAC GATGTTTTGG ACAAGAGACG TGGCCGGGAC CCTGAGATGG
 ATCCTGCTTC TCTCCTCATG CTACAAAACC TGTTCTCTGC ACCGGCCCTG GGACTCTACC

 G G K P R R K N P Q E G L Y N E L Q K D
 1981 GGGGAAAGCC GAGAAGGAAG AACCCCTCAGG AAGGCCTGTA CAATGAACTG CAGAAAGATA
 CCCCTTTCGG CTCTTCCTTC TTGGGAGTCC TTCCGGACAT GTTACTTGAC GTCTTTCTAT

 K M A E A Y S E I G M K G E R R R G K G
 2041 AGATGGCGGA GGCCTACAGT GAGATTGGGA TGAAAGGCGA GCGCCGGAGG GGCAAGGGGC
 TCTACCGCCT CCGGATGTCA CTCTAACCCCT ACTTTCGGCT CGCGGCCTCC CCGTTCCCG

 H D G L Y Q G L S T A T K D T Y D A L H
 2101 ACGATGGCCT TTACCAGGGT CTCAGTACAG CCACCAAGGA CACCTACGAC GCCCTTACA
 TGCTACCGGA AATGGTCCCA GAGTCATGTC GGTGGTTCCT GTGGATGCTG CGGGAAGTGT

 M Q A L P P R *
 2161 TGCAGGCCCT GCCCCCTCGC TGAGCGGCCG GCGAAGGAGG CCTAGATCTA TCGATTGTAC
 ACGTCCGGGA CGGGGGAGCG ACTCGCCGGC CGCTTCCTCC GGATCTAGAT AGCTAACATG

 (SV40pAn-tardio)
 2221 AGCTAGCTCG ACATGATAAG ATACATTGAT GAGTTTGGAC AAACCACAAC TAGAATGCAG
 TCGATCGAGC TGTACTATTC TATGTAAC TAACAACTG TTTGGTGTG ATCTTACGTC

FIG. 5E

2281 TGAAAAAAT GCTTTATTTG TGAATTTGT GATGCTATTG CTTTATTTGT GAAATTTGTG
 ACTTTTTTTA CGAAATAAAC ACTTTAAACA CTACGATAAC GAAATAAACA CTTTAAACAC

2341 ATGCTATTGC TTTATTTGTA ACCATTATAA GCTGCAATAA ACAAGTTAAC AACACAATT
 TACGATAACG AATAAACAT TGGTAATATT CGACGTATT TGTCAATTG TTGTTGTAA

2401 GCATTCATTT TATGTTTCAG GTTCAGGGGG AGGTGTGGCA GGTTTTTTAA AGCAAGTAAA
 CGTAAGTAAA ATACAAAGTC CAAGTCCCCC TCCACACCCT CCAAAAATT TCGTTCATTT

(Ori ColE1-)

2461 ACCTCTACAA ATGTGGTAGA TCCATTTAAA TGTAGCGAA GAACATGTGA GCAAAGGCC
 TGGAGATGTT TACACCATCT AGGTAAATTT ACAATCGCTT CTTGTACACT CGTTTTCCGG

2521 AGCAAAGGC CAGGAACCGT AAAAAGGCCG CGTTGCTGGC GTTTTTCCAT AGGCTCCGCC
 TCGTTTTCCG GTCCTTGCA TTTTCCGGC GCAACGACCG CAAAAGGTA TCCGAGGCGG

2581 CCCCTGACGA GCATCACAAA AATCGACGCT CAAGTCAGAG GTGGCGAAAC CCGACAGGAC
 GGGGACTGCT CGTAGTGTTC TTAGCTGCGA GTTCAGTCTC CACCGCTTTG GGCTGTCTCT

2641 TATAAAGATA CCAGGCGTTT CCCOCTGGAA GCTCCCTCGT GCGCTCTCCT GTTCCGACCC
 ATATTTCTAT GGTCCGCAA GGGGGACCTT CGAGGGAGCA CGCGAGAGGA CAAGGCTGGG

2701 TGCCGCTTAC CGGATACCTG TCCGCCTTTC TCCCTTCGGG AAGCGTGGCG CTTTCTCAAT
 ACGGCGAATG GCCTATGGAC AGGCGGAAAG AGGGAAGCCC TTCGCACCGC GAAAGAGTTA

2761 GCTCACGCTG TAGGTATCTC AGTTCGGTGT AGGTCGTTCC CTCCAAGCTG GGCTGTGTGC
 CGAGTGGAC ATCCATAGAG TCAAGCCACA TCCAGCAAGC GAGGTTGAC CCGACACAGC

2821 ACGAACCCCG CGTTCAGCCC GACCGCTGCG CTTATCCGG TAACTATCGT CTTGAGTCCA
 TGCTTGGGGG GCAAGTCCGG CTGGCGACGC GGAATAGGCC ATTGATAGCA GAACTCAGGT

2881 ACCCGTAAG ACACGACTTA TCGCCACTGG CAGCAGCCAC TGGTAACAGG ATTAGCAGAG
 TGGGCCATTC TGTGCTGAAT AGCGGTGACC GTCGTCCGTG ACCATTGTCC TAATCGTCTC

2941 CGAGGTATGT AGGCGGTGCT ACAGAGTTCT TGAAGTGGTG GCCTAATAC GGCTACACTA
 GCTCCATACA TCCGCCACGA TGTCTCAAGA ACTTCACCAC CGGATTGATG CCGATGTGAT

FIG. 5F

3001 GAAGAACAGT ATTTGGTATC TCGCCTCTGC TGAAGCCAGT TACCTTCGGA AAAAGAGTTG
CTTCTTGTC TAAACCATAG ACGCGAGACG ACTTCGGTCA ATGGAAAGCCT TTTTCTCAAC

3061 GTAGCTCTTG ATCCGGCAAA CAAACCACCG CTGGTAGCGG TGGTTTTTTT GTTTGCAAGC
CATCGAGAAC TAGGCCGTTT GTTTGGTGGC GACCATCGCC ACCAAAAAAA CAAACGTTCC

3121 AGCAGATTAC GCGCAGAAAA AAAGGATCTC AAGAAGATCC TTTGATCTTT TCTACGGGGT
TCGTCTAATG CCGCTCTTTT TTTCTAGAG TTCTTCTAGG AAAC TAGAAA AGATGCCCCA

PacI

~~~~~

3181 CTGACGCTCA GTGGAACGAA AACTCACGTT AAGGGATTTT GTCATGGCT AGTTAATTAA  
GACTGCGAGT CACCTTGCTT TTGAGTGCAA TTCCCTAAAA CCAGTACCGA TCAATTAATT

(SpAn-)

3241 GCTGCAATAA ACAATCATT TTTTCATTGG ATCTGTGTGT TGGTTTTTTG TGTGGGCTTG  
CGACGTTATT TGTTAGTAAT AAAAGTAACC TAGACACACA ACCAAAAAAC ACACCCGAAC

3301 GGGGAGGGGG AGGCCAGAAT GACTCCAAGA GCTACAGGAA GGCAGGTCAG AGACCCCACT  
CCCCCCCC TCCGGTCTTA CTGAGGTTCT CGATGTCTT CCGTCCAGTC TCTGGGGTGA

3361 GGACAAACAG TGGCTGGACT CTGCACCATA ACACACAATC AACAGGGGAG TGAGCTGGAT  
CCTGTTTGTC ACCGACCTGA GACGTGGTAT TGTGTGTTAG TTGTCCCCTC ACTCGACCTA

(hCMV-1Apron-)

3421 CGAGCTAGAG TCCGTTACAT AACTTACGGT AAATGGCCCG CCTGGCTGAC CGCCCAACGA  
GCTCGATCTC AGGCAATGTA TTGAATGCCA TTTACCGGGC GGACCGACTG GCGGGTTGCT

3481 CCCCCGCCCA TTGACGTCAA TAATGACGTA TGTTCCATA GTAACGCCAA TAGGGACTTT  
GGGGCGGGT AACTGCAGTT ATTACTGCAT ACAAGGGTAT CATTGCGGTT ATCCCTGAAA

3541 CCATTGACGT CAATGGGTGG AGTATTTACG GTAAACTGCC CACTTGGCAG TACATCAAGT  
GGTAACTGCA GTTACCCACC TCATAAATGC CATTGACGG GTGAACCGTC ATGTAGTTCA

3601 GTATCATATG CCAAGTACGC CCCCTATTGA CGTCAATGAC GGTAAATGGC CCGCCTGGCA  
CATAGTATAC GGTTCATGCG GGGGATAACT GCAGTTACTG CCATTTACCG GCGGACCGT

FIG. 5G

3661 TTATGCCCGAG TACATGACCT TATGGGACTT TCCTACTTGG CAGTACATCT ACGTATTAGT  
 AATACGGGTC ATGTAAGGGA ATACCCTGAA AGGATGAACC GTCATGTAGA TGCATAATCA

3721 CATCGCTATT ACCATGGTGA TGCGGTTTTG GCAGTACATC AATGGGCGTG GATAGCGGTT  
 GTAGCGATAA TGGTACCACT ACGCCAAAAC CGTCATGTAG TTACCCGCAC CTATCGCCAA

3781 TGA CTACCGG GGATTTCCAA GTCTCCACCC CATTGACGTC AATGGGAGTT TGTTTTGGCA  
 ACTGAGTGCC CCTAAAGGTT CAGAGGTGGG GTA ACTGCAG TTACCCTCAA ACAA AACCGT

3841 CCAAAATCAA CGGGACTTTC CAAAATGTCG TAACA ACTCC GCCCCATTGA CGCAAATGGG  
 GGT TTTAGTT GCCCTGAAAG GTTTTACAGC ATTGTTGAGG CGGGGTA ACT GCGTTTACCC

3901 CGGTAGGCGT GTACGGTGGG AGGTCTATAT ARG CAGAGCT CGTTTAGTGA ACCGT CAGAT  
 GCCATCCGCA CATGCCACCC TCCAGATATA TTCGTCTCGA GCAAATCACT TGGCAGTCTA

3961 CGCCTGGAGA CGCCATCCAC GCTGTTTTGA CCTCCATAGA AGACACCGGG ACCGATCCAG  
 GCGGACCTCT GCGGTAGGTG CGACAAA ACT GGAGGTATCT TCTGTGGCCC TGGCTAGGTC

4021 CCTCCGCGGC CGGGAACGGT GCATTGGAAC GCGGATTCCC CGTGCCAAGA GTGACGTAAG  
 GGAGGCGCCG GCCCTTGCCA CGTAACCTTG CGCCTAAGGG GCACGGTTCT CACTGCATTC

4081 TACCGCCTAT AGAGTCTATA GGCCACCTA GTTGTGACCG GCGCCTAGTG TTGACAATTA  
 ATGGCGGATA TCTCAGATAT CCGGGTGGAT CAACACTGGC CGCGGATCAC AACTGTTAAT

4141 ATCATCGGCA TAGTATAATA CGACTCACTA TAGGAGGGCC ACCATGTCGA CTACTAACCT  
 TAGTAGCCGT ATCATATTAT GCTGAGTGAT ATCCTCCCGG TGGTACAGCT GATGATTGGA

(HyTK-)

M K K P E L

4201 TCTTCTCTTT CCTACAGCTG AGATCACCGG TAGGAGGGCC ATCATGAAAA AGCCTGAACT  
 AGAAGAGAAA GGATGTCGAC TCTAGTGGCC ATCCTCCCGG TAGTACTTTT TCGGACTTGA

T A T S V A K F L I E K F D S V S D L M

4261 CACCGCGACG TCTGTCGCGA AGTTTCTGAT CGAAAAGTTC GACAGCGTCT CCGACCTGAT  
 GTGGCGCTGC AGACAGCGCT TCAAAGACTA GCTTTTCAAG CTGTCGCAGA GGCTGGACTA

FIG. 5H

Q L S E G E E S R A F S F D V G G R G Y  
 4321 GCAGCTCTCG GAGGGCGAAG AATCTCGTGC TTCAGCTTC GATGTAGGAG GGCCTGGATA  
 CGTCGAGAGC CTCCTCGCTTC TTAGAGCACG AAAGTCGAAG CTACATCCTC CCGCACCTAT  
  
 V L R V N S C A D G F Y K D R Y V Y R H  
 4381 TGTCCTGCGG GTAAATAGCT GCGCCGATGG TTTCTACAAA GATCGTTATG TTTATCGGCA  
 ACAGGACGCC CATTATCGA CCGGGCTACC AAAGATGTTT CTAGCAATAC AAATAGCCGT  
  
 F A S A A L P I P E V L D I G E F S E S  
 4441 CTTTGCATCG GCCGCGCTCC CGATTCCGGA AGTGCTTGAC ATTGGGGGAT TCAGCGAGAG  
 GAAACGTAGC CCGCGCGAGG GCTAAGGCCT TCACGAAGT TAACCCCTTA AGTCGCTCTC  
  
 L T Y C I S R R A Q G V T L Q D L P E T  
 4501 CCTGACCTAT TGCATCTCCC GCCGTGCACA GGGTGTACG TTGCAAGACC TGCCTGAAAC  
 GGACTGGATA ACGTAGAGGG CCGCACGTGT CCCACAGTGC AACGTTCTGG ACGGACTTTG  
  
 E L P A V L Q P V A E L M D A I A A A D  
 4561 CGAACTGCCC GCTGTTCTGC AACCCGTCGC GGAGCTCATG GATGCGATCG CTGCGGCCGA  
 GCTTGACGGG CGACAAGACG TTGGGCAGCG CCTCGAGTAC CTACGCTAGC GACGCCGGCT  
  
 L S Q T S G F G P F G P Q G I G Q Y T T  
 4621 TCTTAGCCAG ACGAGCGGGT TCGGCCATT CGGACCGCAA GGAATCGGTC AATACACTAC  
 AGAATCGGTC TGCTCGCCCA AGCCGGGTAA GCCTGGCGTT CCTTAGCCAG TTATGTGATG  
  
 W R D F I C A I A D P H V Y H W Q T V M  
 4681 ATGGCGTGAT TTCATAIGCG CGATTGCTGA TCCCCATGTG TATCACTGGC AAACGTGTGAT  
 TACCGCACTA AAGTATACGC GCTAACGACT AGGGGTACAC ATAGTGACCG TTTGACACTA  
  
 D D T V S A S V A Q A L D E L M L N A E  
 4741 GGACGACACC GTCAGTGCGT CCGTCGCGCA GGCTCTCGAT GAGCTGATGC TTTGGGCCGA  
 CCTGCTGTGG CAGTCACGCA GGCAGCGCGT CCGAGAGCTA CTCGACTACG AAACCCGGCT  
  
 D C P E V R H L V H A D F G S N N V L T  
 4801 GGACTGCCCC GAAGTCCGGC ACCTCGTGCA CGCGGATTC GGCTCCAACA ATGCTCTGAC  
 CCTGACGGGG CTTAGGCCG TGGAGCACGT GCGCCTAAAG CCGAGGTTGT TACAGGACTG

FIG. 5I

D N G R I T A V I D W S E A M F G D S Q  
 4861 GGACAATGGC CGCATAACAG CGGTCAATGA CTGGAGCGAG GCGATGTTG GGGATTCCCA  
 CCTGTTACCG GCGTATTGTC GCCAGTAACT GACCTCGCTC CGCTACAAGC CCCTAAGGGT  
  
 Y E V A N I F F W R P W L A C M E Q Q T  
 4921 ATACGAGGTC GCCAACATCT TCTTCTGGAG GCCGTGGTTG GCTTGTATGG AGCAGCAGAC  
 TATGCTCCAG CGGTGTAGA AGAAGACCTC CGGCACCAAC CGAACATACC TCGTCGTCTG  
  
 R Y F E R R H P E L A G S P R L R A Y M  
 4981 GCGCTACTTC GAGCGGAGGC ATCCGGAGCT TGCAGGATCG CCGCGGCTCC GGGCGTATAT  
 CGCGATGAAG CTCGCCTCCG TAGGCCTCGA ACGTCTAGC GGGCGCGAGG CCCGCATATA  
  
 L R I G L D Q L Y Q S L V D G N F D D A  
 5041 GCTCCGCATT GGTCTTGACC AACTCTATCA GAGCTTGTT GACGGCAATT TCGATGATGC  
 CGAGGCGTAA CCAGAACTGG TTGAGATAGT CTCGAACCAA CTGCCGTTAA AGCTACTAGC  
  
 A W A Q G R C D A I V R S G A G T V G R  
 5101 AGCTTGGGCG CAGGGTCGAT GCACGCAAT CGTCCGATCC GGAGCCGGGA CTGTCGGGCG  
 TCGAACCCGC GTCCAGCTA CGCTGCGTTA GCAGGCTAGG CCTCGGCCCT GACAGCCCCG  
  
 T Q I A R R S A A V W T D G C V E V A S  
 5161 TACACAAATC GCCCGCAGAA GCGCGGCCGT CTGGACCGAT GGCTGTGTAG AAGTCGCGTC  
 ATGTGTTTAG CGGGCGTCTT CGGCGCGGCA GACCTGGCTA CCGACACATC TTCAGCGCAG  
  
 A F D Q A A R S R G H S N R R T A L R P  
 5221 TCGGTTGAC CAGGCTGCGC GTTCTGCGG CCATAGCAAC CGACGTACGG CGTTGCGCCC  
 ACGCAAGCTG GTCCGACGCG CAAGAGCGCC GGTATCGTTG GCTGCATGCC GCAACGCGGG  
  
 R R Q Q E A T E V R P E Q K M P T L L R  
 5281 TCGCCGGCAG CAAGAAGCCA CGGAAGTCCG CCCGGAGCAG AAAATGCCCA CGCTACTGCG  
 ACGGCCCCTC GTTCTTCGGT GCCTTCAGGC GGGCCTCGTC TTTTACGGGT GCGATGACGC  
  
 V Y I D G P H G M G K T T T T Q L L V A  
 5341 GGTTTATATA GACGGTCCCC ACGGGATGGG GAAAACCACC ACCACGCAAC TGCTGGTGGC  
 CCAAATATAT CTGCCAGGGG TGCCCTACCC CTTTGGTGG TGGTGC GTT GACGACCACC

FIG. 5J

L G S R D D I V Y V P E P M T Y W R V L  
 5401 CCTGGGTTTCG CGCGACGATA TCGTCTACGT ACCCGAGCCG ATGACTTACT GGCGGGTGCT  
 GGACCCAAGC GCGCTGCTAT AGCAGATGCA TGGGCTCGGC TACTGAATGA CCGCCCACGA  
  
 G A S E T I A N I Y T T Q H R L D Q G E  
 5461 GGGGGCTTCC GAGACAATCG CGAACATCTA CACCACACAA CACCGCCTCG ACCAGGGTGA  
 CCCCCGAAGG CTCTGTTAGC GCTGTAGAT GTGGTGTSTT GTGGCGGAGC TGGTCCCACT  
  
 I S A G D A A V V M T S A Q I T M G M P  
 5521 GATATCGGCC GGGGACGCGG CGGTGGTAAT GACAAGCGCC CAGATAACAA TGGGCATGCC  
 CTATAGCCGG CCCCTGCGCC GCCACCATTA CTGTTGCGGG GTCTATTGTT ACCCGTACGG  
  
 Y A V T D A V L A P H I G G E A G S S H  
 5581 TTATGCCGTG ACCGACGCCG TTCTGGCTCC TCATATCGGG GGGGAGGCTG GGAGCTCACA  
 AATACGGCAC TGGCTGCGGC AAGACCGAGG AGTATAGCCC CCCCTCCGAC CCTCGAGTGT  
  
 A P P P A L T L I F D R H P I A A L L C  
 5641 TGCCCCGCCC CCGGCCCTCA CCCTCATCTT CGACCGCCAT CCCATCGCCG CCCTCCTGTG  
 ACGGGGCGGG GCGCGGGAGT GGGAGTAGAA GCTGGCGGTA GGGTAGCGGC GGGAGGACAC  
  
 Y P A A R Y L M G S M T P Q A V L A F V  
 5701 CTACCCGGCC GCGCGGTACC TTATGGGCAG CATGACCCCC CAGGCCGTGC TGGCGTTCGT  
 GATGGGCCGG CGCGCCATGG AATACCCGTC GTACTGGGGG GTCCGGCAGC ACCGCAAGCA  
  
 A L I P P T L P G T N I V L G A L P E D  
 5761 GGCCCTCATC CCGCCGACCT TGCCCGGCAC CAACATCGTG CTTGGGGCCC TTCCGGAGGA  
 CCGGGAGTAG GCGCGCTGGA ACGGGCCGTG GTTGTAGCAC GAACCCCGGG AAGGCCTCCT  
  
 R H I D R L A K R Q R P G E R L D L A M  
 5821 CAGACACATC GACCGCCTGG CCAAACGCCA GCGCCCGGC GAGCGGCTGG ACCTGGCTAT  
 GTCTGTGTAG CTGGCGGACC GGTGTGCGGT CGCGGGGCCG CTCGCCGACC TGGACCGATA  
  
 L A A I R R V Y G L L A N T V R Y L Q C  
 5881 GCTGGCTGCG ATTCGCCGCG TTTACGGGCT ACTTGCCAAT ACGGTGCGGT ATCTGCAGTG  
 CGACCGACGC TAAGCGGCGC AAATGCCCGA TGAACGGTTA TGCCACGCCA TAGACGTCAC

FIG. 5K

G G S W R E D W G Q L S G T A V P P Q G  
 5941 CGGCGGGTCG TGGCGGGAGG ACTGGGGACA GCTTTCGGGG ACGGCCGTGC CGCCCCAGGG  
 GCCGCCCAGC ACCGCCCTCC TGACCCCTGT CGAAAGCCCC TGCCGGCAGC GCGGGGTCCC

A E P Q S N A G P R P H I G D T L F T L  
 6001 TGCCGAGCCC CAGAGCAACG CGGGCCACG ACCCCATATC GGGGACACGT TATTTACCCT  
 ACGGCTCGGG GTCTCGTTGC GCCCGGGTGC TGGGGTATAG CCCCTGTGCA ATAAATGGGA

F R A P E L L A P N G D L Y N V F A W A  
 6061 GTTTCGGGCC CCCGAGTTGC TGGCCCCAA CGGCGACCTG TATAACGTGT TTGCCTGGGC  
 CAAAGCCCGG GGGCTCAACG ACCGGGGT T GCGCTGGAC ATATTGCACA AACGGACCCG

L D V L A K R L R S M H V F I L D Y D Q  
 6121 CTTGGACGTC TTGGCCAAAC GCCTCCGTT CATGCACGTC TTTATCCTGG ATTACGACCA  
 GAACCTGCAG AACC GGTTTG CGGAGGCAAG GTACGTGCAG AAATAGGACC TAATGCTGGT

S P A G C R D A L L Q L T S G M V Q T H  
 6181 ATCGCCCGCC GGCTGCCGGG ACGCCCTGCT GCAACTTACC TCCGGGATGG TCCAGACCCA  
 TAGCGGGCGG CCGACGGCCC TGCGGGACGA CGTTGAATGG AGGCCCTACC AGGTCTGGGT

V T T P G S I P T I C D L A R T F A R E  
 6241 CGTCACCACC CCCGGCTCCA TACCGACGAT ATGCGACCTG GCGCGCACGT TTGCCCCGGA  
 GCAGTGGTGG GGGCCGAGGT ATGGCTGCTA TACGCTGGAC CGCGCGTGCA AACGGGCCCT

M G E A N \* (Bgh pAn-)

6301 GATGGGGGAG GCTAACTGAG TCGAGAATTC GCTAGAGGGC CCTATTCTAT AGTGTACCT  
 CTACCCCCTC CGATTGACTC AGCTCTTAAG CGATCTCCCG GGATAAGATA TCACAGTGA

6361 AAATGCTAGA GCTCGCTGAT CAGCCTCGAC TGTGCCTTCT AGTTGCCAGC CATCTGTTGT  
 TTTACGATCT CGAGCGACTA GTCGGAGCTG ACACGGAAGA TCAACGGTCG GTAGACAACA

6421 TTGCCCCCTC CCCGTGCCTT CCTTGACCCT GGAAGGTGCC ACTCCCCTG TCCTTTCCTA  
 AACGGGGAGG GGGCACGGAA GGAAGTGGGA CCTTCCACGG TGAGGGTGAC AGGAAAGGAT

6481 ATAAAATGAG GAAATTGCAT CGCATTGTCT GAGTAGGTGT CATTCTATTC TGGGGGGTGG  
 TATTTTACTC CTTTAACGTA GCGTAACAGA CTCATCCACA GTAAGATAAG ACCCCCCACC

FIG. 5L

6541 GGTGGGGCAG GACAGCAAGG GGGAGGATTG GGAAGACAAT AGCAGGCATG CGCAGGGCCC  
CCACCCCGTC CTGTCGTTCC CCCTCCTAAC COTTCTGTTA TCGTCCGTAC GCGTCCCGGG

6601 AATTGCTCGA GCGGCCGCAA TAAATATCT TTATTTTCAT TACATCTGTG TGTTGGTTTT  
TTAACGAGCT CGCCGGCGTT ATTTTATAGA AATAAAGTA ATGTAGACAC ACAACCAAAA

6661 TTGTGTGAAT CGTAACTAAC ATACGCTCTC CATCAAAACA AACGAAACA AAACAACCTA  
AACACACTTA GCATTGATTG TATGCGAGAG GTAGTTTTGT TTTGCTTTGT TTTGTTTGAT

6721 GCAAAATAGG CTGTCCCAG TGCAAGTGCA GGTGCCAGAA CATTCTCTA (SEQ ID NO:13)  
CGTTTTATCC GACAGGGGTC ACGTTCACGT CCACGGTCTT GTAAAGAGAT (SEQ ID NO:14)

secuencia de aminoácidos de IL13zetaquina (SEQ ID NO:15).  
secuencia de aminoácidos de HyTK (SEQ ID NO:16).

FIG. 6

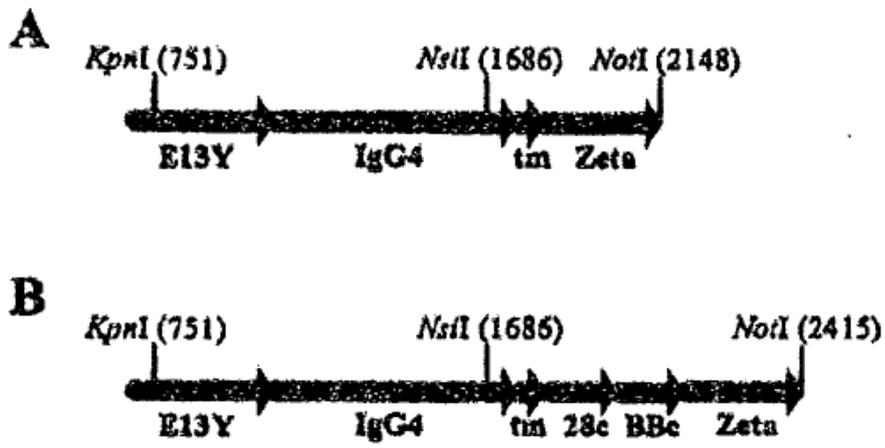


FIG. 7

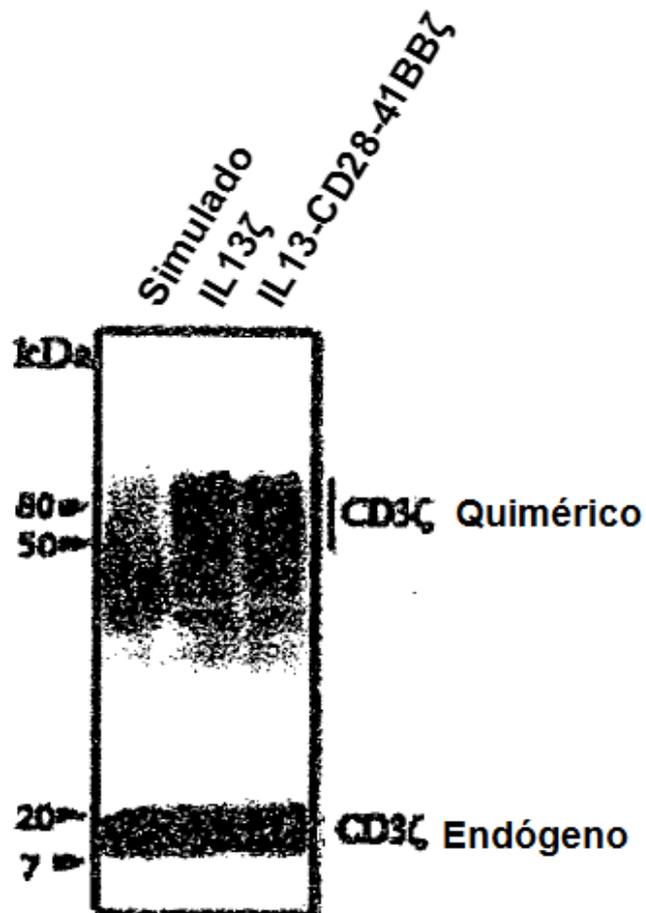


FIG. 8

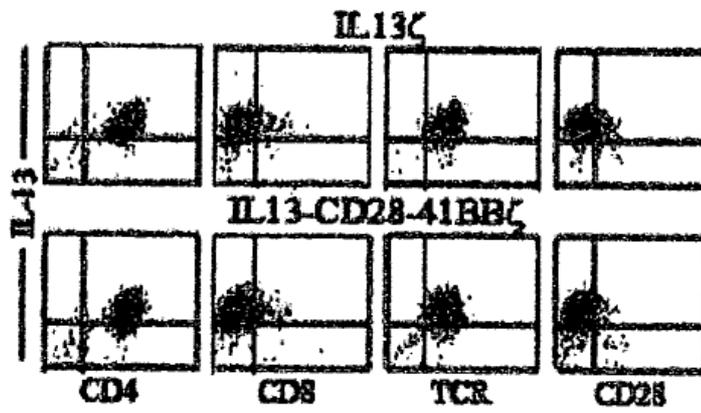


FIG. 9

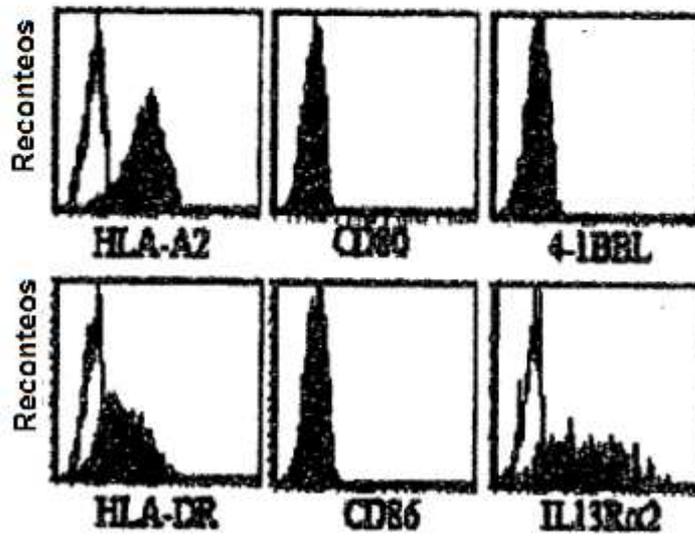


FIG. 10

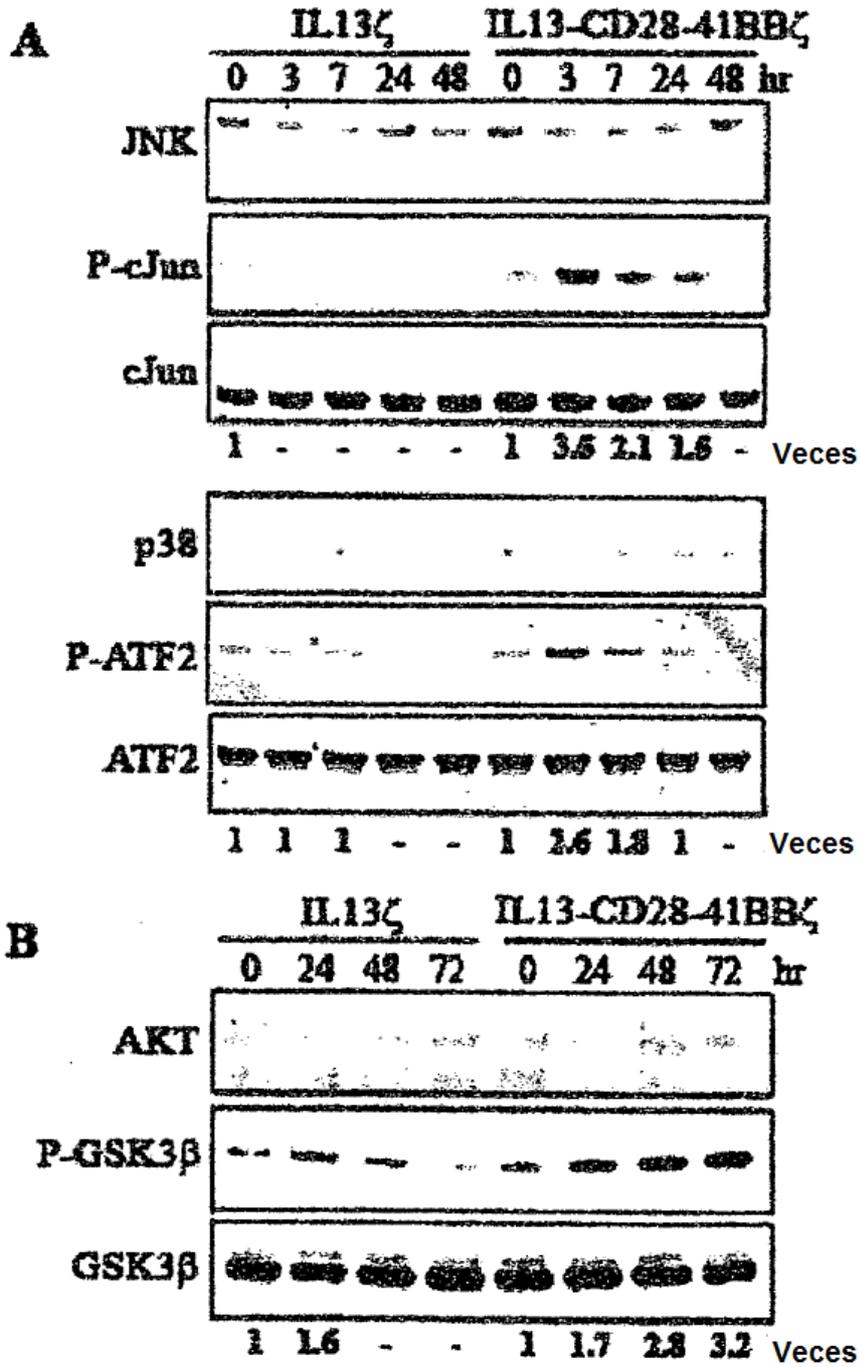


FIG. 11

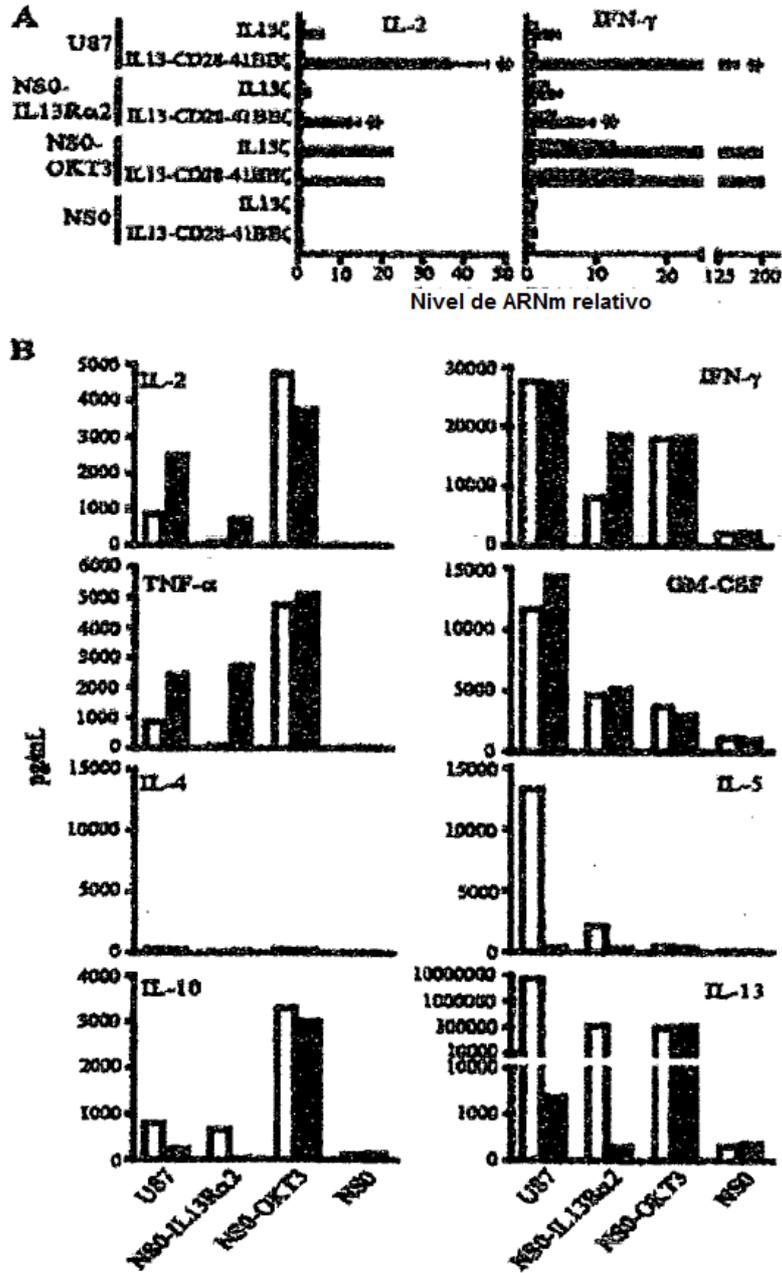


FIG. 12

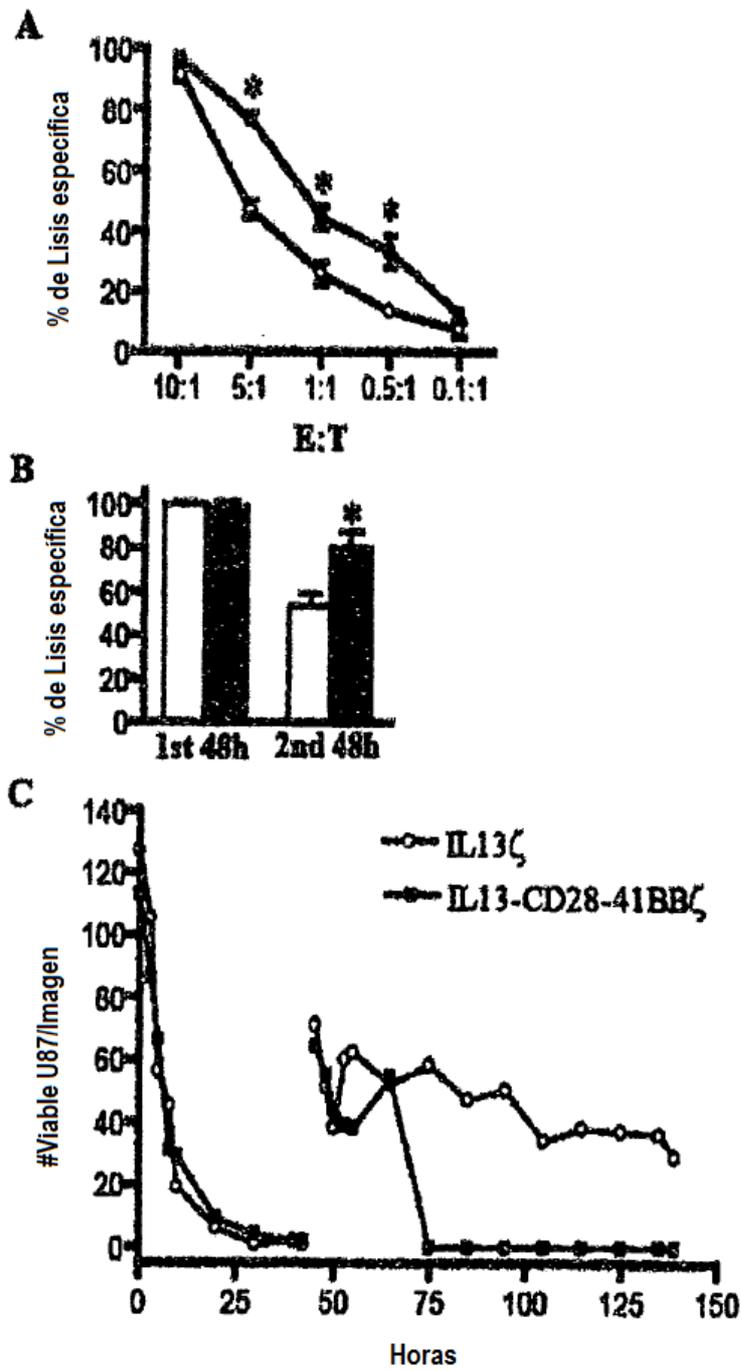


FIG. 13

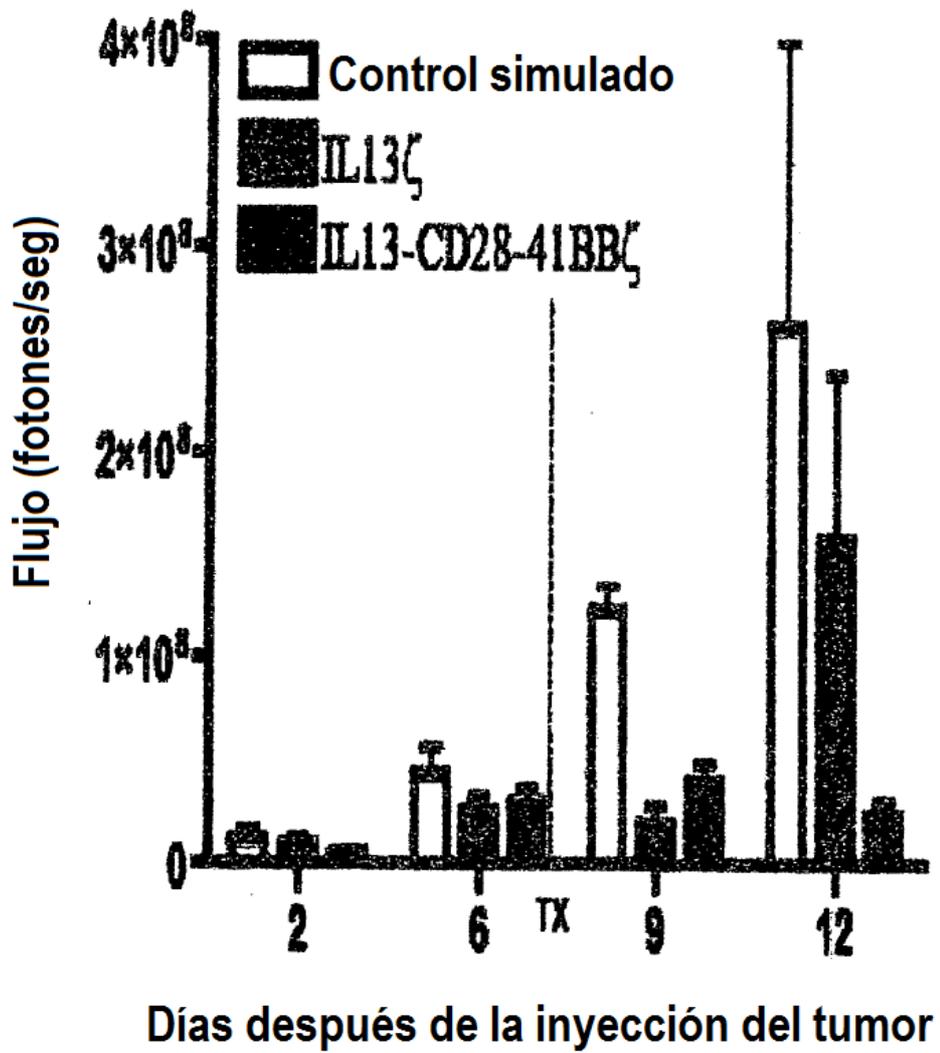


FIG. 14

ATGCTGCTGC TGGTGACCAG  
 CCTGCTGCTG TGGGAGCTGC CCCACCCCGC CTTTCTGCTG ATCCCTGGCC CCGTGCCCCC  
 TAGCACCGCC CTGCGCTACC TGATCGAGGA ACTGGTGAAC ATCACCAGCA ACCAGAAAGC  
 CCCCCTGTGC AACGGCAGCA TGGTGTGGAG CATCAACCTG ACCGCCGGCA TGTACTGTGC  
 CGCCCTGGAA AGCCTGATCA ACGTGAAGCG CTGCAGCGCC ATCGAGAAA CCCAGCGGAT  
 GCTGTCCGGC TTCTGCCCC ACAAGGTGTC CGCCGGACAG TTCAGCAGCC TGCACGTGGC  
 GGACACCAAG ATCGAGGTGG CCCAGTTCGT GAAGGACCTG CTGCTGCACC TGAAGAAGCT  
 GTTCCGGGAG GGCCGGTTCA ACGAGAGCAA GTACGGCCCT CCCTGCCCC CTTGCCCTGC  
 CCCAGAGTTC CTGGGCGGAC CCAGCGTGT CCGTGTCCCC CCCAAGCCCA AGGACACCCT  
 GATGATCAGC CGGACCCCTG AGGTGACCTG CGTGGTGGTG GACGTGAGCC AGGAAGATCC  
 TGAGGTCCAG TTCAATTGGT ACGTGGACGG CGTGGAAGTG CACAACGCCA AGACCAAGCC  
 CAGAGAGGAA CAGTTCAACA GCACCTACCG GGTGGTGTCT GTGCTGACCG TGCTGCACCA  
 GGACTGGCTG AACGGCAAAG AATACAAGTG CAAGGTGTCC AACAAAGGCC TGCCAGCAG  
 CATCGAAAAG ACCATCAGCA AGGCCAAGGG CCAGCCTCGC GAGCCCCAGG TGTACACCCT  
 GCCTCCCTCC CAGGAAGAGA TGACCAAGAA CCAGGTGTCC CTGACCTGCC TGGTGAAGGG  
 CTTCTACCCC AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAC GGCCAGCCTG AGAACAACATA  
 CAAGACCACC CCTCCCGTGC TGGACAGCGA CGGCAGCTTC TTCCTGTACA GCCGGCTGAC  
 CGTGGACAAG AGCCGGTGGC AGGAAGGCAA CGTCTTTAGC TGCAGCGTGA TGCACGAGGC  
 CCTGCACAAC CACTACACC AGAAGAGCCT GAGCCTGTCC CTGGGCAAGA TGTTCTGGGT  
 GCTGGTGGTG GTGGGCGGGG TGCTGGCCTG CTACAGCCTG CTGGTGACAG TGGCCTTCAT  
 CATCTTTTGG GTGCGGAGCA AGCGGAGCAG AGGCGGCCAC AGCGACTACA TGAACATGAC  
CCCCAGACGG CCTGGCCCCA CCCGGAAGCA CTACCAGCCC TACGCCCCAC CCAGGGACTT  
TGCCGCCTAC CGGTCCGGCG GAGGGCGGGT GAAGTTCAGC AGAAGCGCCG ACGCCCCTGC  
 CTACCAGCAG GGCCAGAATC AGCTGTACAA CGAGCTGAAC CTGGGCAGAA GGGAAAGAGTA  
 CGACGTCCCTG GATAAGCGGA GAGGCCGGGA CCCTGAGATG GCGGCAAGC CTCGGCGGAA  
 GAACCCCCAG GAAGGCCTGT ATAACGAACT GCAGAAAGAC AAGATGGCCG AGGCCTACAG  
 CGAGATCGGC ATGAAGGGCG AGCGGAGGCG GGGCAAGGGC CACGACGGCC TGTATCAGGG  
 CCTGTCCACC GCCACCAAG ATACCTACGA CGCCCTGCAC ATGCAGGCC TGCCECAAG  
 GTGA (SEQ ID NO:36)

FIG. 15

ATGCT TCTCCTGGTG ACAAGCCTTC TGCTCTGTGA GTTACCACAC  
 CCAGCATTC TCCTGATCCC AGGCCCTGTG CCTCCCTCTA CAGCCCTCAG GGAGTCATT  
 GAGGAGCTGG TCAACATCAC CCAGAACCAG AAGGCTCCGC TCTGCAATGG CAGCATGGTA  
 TGGAGCATCA ACCTGACAGC TGGCATGTAC TGTGCAGCCC TGGAAATCCCT GATCAACGTG  
 TCAGGCTGCA GTGCCATCGA GAAGACCCAG AGGATGCTGA GCGGATTCTG CCCGCACAAG  
 GTCTCAGCTG GGCAGTTTTC CAGCTTGCAT GTCCGAGACA CCAAAATCGA GGTGGCCCAG  
 TTTGTAAGG ACCTGCTCTT ACATTTAAAG AAACCTTTTC GCGAGGGACG GTTCAACGAG  
 TCCAAATATG GTCCCCATG CCCACCATGC CCAGCACCTG AGTTCCTGGG GGGACCATCA  
 GTCTTCCTGT TCCCCCAA ACCCAAGGAC ACTTCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC  
 ACGTGCCTGG TGGTGGACGT GAGCCAGGAA GACCCCGAGG TCCAGTTCAA CTGGTACGTG  
 GATGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTT CAACAGCACG  
 TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCCT CACCAGSACT GGCTGAACGG CAAGGAGTAC  
 AAGTGAAGG TCTCCAACAA AGGCCTCCCG TCCTCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC  
 AAAGGGCAGC CCCGAGAGCC ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCAGGA GGAGATGACC  
 AAGAACCAGG TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ACCCCAGCGA CATCGCCGTG  
 GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC CGTGCTGGAC  
 TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTACAGCAGG CTAACCGTGG ACAAGAGCAG GTGGCAGGAG  
 GGGAAATGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACACAGAAG  
 AGCCTCTCCC TGTCTCTGGG TAAAATGGCC CTGATTGTGC TGGGGGGCGT CGCCGGCCTC  
 CTGCTTTTCA TTGGGCTAGG CATCTTCTTC AGGAGTBAGA GGAGCAGGCT CCTGCACAGT  
GACTACATGA ACATGACTCC CCGCCGCCCT GGGCCACCC GCAAGCATTG CCAGCCCTAT  
GCCCCACCAC GCGACTTCGC AGCCTATCGC TCCGGAGGTG GCAAACGGGG CAGAAGAAA  
**CTCCTGTATA TATTCAAACA ACCATTTATG AGACCAGTAC AAACACTCA AGAGGAAGAT**  
**GGCTGTAGCT GCCGATTTCC AGAAGAAGAA GAAGGAGGAT GTGAACTGGG AGGTGGCAGA**  
 GTGAAGTTCA GCAGGAGCGC AGACGCCCC GCGTACCAGC AGGGCCAGAA CCAGCTCTAT  
 AACGAGCTCA ATCTAGGACG AAGAGAGGAG TACGATGTTT TGGACAAGAG ACGTGGCCGG  
 GACCCTGAGA TGGGGGGAAA GCCGAGAAGG AAGAACCCTC AGGAAGGCCT GTACAATGAA  
 CTGCAGAAAG ATAAGATGGC GGAGGCCTAC AGTGAGATTG GGATGAAAGG CGAGCGCCGG  
 AGGGGCAAGG GGCACGATGG CCTTTACCAG GGTCTCAGTA CAGCCACCAA GGACACCTAC  
 GACGCCCTTC ACATGCAGGC CCTGCCCCCT CGCTGA (SEQ ID NO:37)

FIG. 16

AT GCTTCTCCTG GTGACAAGCC TTCTGCTCTG TGAGTTACCA  
 CACCCAGCAT TCCTCCTGAT CCCAGGCCCT GTGCCTCCCT CTACAGCCCT CAGGTACCTC  
 ATTGAGGAGC TGGTCAACAT CACCCAGAAC CAGAAGGCTC CGCTCTGCAA TGGCAGCATG  
 GTATGGAGCA TCAACCTGAC AGCTGGCATG TACTGTGCAG CCCTGGAATC CCTGATCAAC  
 GTGTCAGGCT GCAGTGCCAT CGAGAAGACC CAGAGGATGC TGAGCGGATT CTGCCCGCAC  
 AAGGTCTCAG CTGGGCAGTT TTCCAGCTTG CATGTCCGAG ACACCAAAT CGAGGTGGCC  
 CAGTTTGTAAGGACCTGCT CTTACATTTA AAGAACTTT TTCGCGAGGG ACGGTTCAAC  
 GAGTCCAAAT ATGGTCCCC ATGCCACCA TGCCAGCAC CTGAGTTCC TGGGGGACCA  
 TCAGTCTTCC TGTCCCCCC AAAACCCAAG GACACTCTCA TGATCTCCCG GACCCCTGAG  
 GTCACGTGCG TGGTGGTGA CGTGAGCCAG GAAGACCCCG AGGTCCAGTT CAACTGGTAC  
 GTGGATGGCG TGGAGGTGCA TAATGCCAAG ACAAAGCCGC GGGAGGAGCA GTTCAACAGC  
 ACGTACCGTG TGGTCAGCGT CCTCACCGTC CTGCACCAGG ACTGGCTGAA CGGCAAGGAG  
 TACAAGTGCA AGGTCTCAA CAAAGGCCTC CCGTCCTCCA TCGAGAAAAC CATCTCCAA  
 GCCAAAGGGC AGCCCCGAGA GCCACAGGTG TACACCCTGC CCCCATCCA GGAGGAGATG  
 ACCAAGAACC AGGTCAGCCT GACCTGCCTG GTCAAAGGCT TCTACCCAG CGACATCGCC  
 GTGGAGTGGG AGAGCAATGG GCAGCCGGAG AACAACTACA AGACCACGCC TCCCCTGCTG  
 GACTCCGACG GTCCTTCTT CCTCTACAGC AGGCTAACCG TGGACAAGAG CAGGTGGCAG  
 GAGGGGAATG TCTTCTCATG CTCCTGATG CATGAGGCTC TGCACAACCA CTACACACAG  
 AAGAGCCTCT CCCTGTCCCT AGGTAAATT TGGGTGCTGG TGGTGGTTGG TGGAGTCTG  
GCTTGCTATA GCTTGCTAGT AACAGTGGCC TTTATTATTT TCTGGGTGAG GAGTAAGAGG  
 AGCAGGCTCC TGCACAGTGA CTACATGAAC ATGACTCCCC GCGCCCCGG GCCCACCAGC  
 AAGCATTACC AGCCCTATGC CCCACCAGC GACTTCGCAG CCTATCGCTC CAGGGACCAG  
 AGGCTGCCCC CCGATGCCCA CAAGCCCCCT GGGGAGGCA GTTCCGGAC CCCCATCCAA  
 GAGGAGCAGG CCGACGCCCA CTCCACCCTG GCCAAGATCA GAGTGAAGTT CAGCAGGAGC  
GCAGACGCCC CCGGTACCA GCAGGGCCAG AACAGCTCT ATAACGAGCT CAATCTAGGA  
CGAAGAGAGG AGTACGATGT TTTGGACAAG AGACGTGGCC GGGACCCGTA GATGGGGGA  
 AAGCCGAGAA GGAAGAACC TCAGGAAGGC CTGTACAATG AACTGCAGAA AGATAAGATG  
GCGGAGCCCT ACAGTGAGAT TGGGATGAAA GCGAGCGCC GGAGGGCAA GGGGCACGAT  
GGCCTTACC AAGGTCTCAG TACAGCCACC AAGGACCTT ACGACGCCCT TCACATGCAG  
GCCCTGCCCC CTGGCTGA (SEQ ID NO:38)

FIG. 17

ATGCTTCTCC TGGTGACAAG CCTTCTGCTC TGTGAGTTAC CACACCCAGC ATTCCTCCTG  
 ATCCCAGGCC CTGTGCCTCC CTCTACAGCC CTCAGGTACC TCATTGAGGA GCTGGTCAAC  
 ATCACCCAGA ACCAGAAGGC TCCGCTCTGC AATGGCAGCA TGGTATGGAG CATCAACCTG  
 ACAGCTGGCA TGTACTGTGC AGCCCTGGAA TCCCTGATCA ACGTGTCCAG CTGCAGTGCC  
 ATCGAGAAGA CCCAGAGGAT GCTGAGCGGA TTCTGCCCCG ACAAGGTCTC AGCTGGGCAG  
 TTTTCCAGCT TGCATGTCCG AGACACCAA ATCGAGGTGG CCCAGTTTGT AAAGGACCTG  
 CTCTTACATT TAAAGAACT TTTTCGCGAG GGACGGTTCA ACGAGTCCAA ATATGGTCCC  
 CCATGCCCAC CATGCCCAGC ACCTGAGTTC CTGGGGGGAC CATCAGTCTT CCTGTTCCCC  
 CAAAAACCCA AGGACACTCT CATGATCTCC CGGACCCCTG AGGTCACGTG CGTGGTGGTG  
 GACGTGAGCC AGGAAGACCC CGAGGTCCAG TTCAACTGGT ACGTGGATGG CGTGGAGGTG  
 CATAATGCCA AGACAAAGCC GCGGGAGGAG CAGTTCAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC  
 GTCCTCACCG TCCTGCACCA GGACTGGCTG AACGGCAAGG AGTACAAGTG CAAGGTCTCC  
 AACAAAGGCC TCCCGTCCTC CATCGAGAAA ACCATCTCCA AAGCCAAAGG GCAGCCCCGA  
 GAGCCACAGG TGTACACCCCT GCCCCCATCC CAGGAGGAGA TGACCAAGAA CCAGGTCCAGC  
 CTGACCTGCC TGGTCAAAGG CTTCTACCCC AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAT  
 GGGCAGCCGG AGAACAATA CAAGACCAG CCTCCCGTGC TGGACTCCGA CGGCTCCTTC  
 TTCCTCTACA GCAGGCTAAC CGTGGACAAG AGCAGGTGGC AGGAGGGGAA TGTCTTCTCA  
 TGCTCCGTGA TGCATGAGGC TCTGCACAAC CACTACACAC AGAAGAGCCT CTCCCTGTCC  
 CTAGGTAATAA TGTTTTGGGT GCTGGTGGTG GTTGGTGGAG TCCTGGCTTG CTATAGCTTG  
 CTAGTAACAG TGGCCTTTAT TATTTCTGG GTGAGGAGTA AGAGGAGCAG GGGCGGACAC  
AGTGACTACA TGAACATGAC TCCCCGCCGC CCTGGGCCCA CCGCAAGCA TTACCAGCCC  
TATGCCCCAC CACGGGACTT CGCAGCCTAT CGCTCCGGAG GTGGCAAACG GGGCAGAAAG  
**AAACTCCTGT ATATATTCAA ACAACCATT ATGAGACCAG TACAACTAC TCAAGAGGAA**  
**GATGGCTGTA GCTGCCGATT TCCAGAAGAA GAAGAAGGAG GATGTGAACT GGGAGGTGGC**  
 AGAGTGAAGT TCAGCAGGAG CGCAGACGCC CCCGCGTACC AGCAGGGCCA GAACCAGCTC  
 TATAACGAGC TCAATCTAGG ACGAAGAGAG GAGTACGATG TTTTGGACAA GAGACGTGGC  
 CGGGACCCTG AGATGGGGGG AAAGCCGAGA AGGAAGAACC CTCAGGAAGG CCTGTACAAT  
 GAACTGCAGA AAGATAAGAT GGCGGAGGCC TACAGTGAGA TTGGGATGAA AGGCGAGCGC  
 CGGAGGGGCA AGGGGCACGA TGGCCTTTAC CAGGGTCTCA GTACAGCCAC CAAGGACACC  
 TACGACGCCC TTCACATGCA GGCCCTGCCC CCTCGCTGA (SEQ ID NO:39)

FIG. 18

ATGCTTCTCC TGGTGACAAG CCTTCTGCTC  
 TGTGAGTTAC CACACCCAGC ATTCCTCCTG ATCCCAGGCC CTGTGCCTCC CTCTACAGCC  
 CTCAGGTACC TCATTGAGGA GCTGGTCAAC ATCACCCAGA ACCAGAAGGC TCCGGTCTGC  
 AATGGCAGCA TGGTATGGAG CATCAACCTG ACAGCTGGCA TGTACTGTGC AGCCCTGGAA  
 TCCCTGATCA ACGTGTGAGG CTGCAGTGCC ATCGAGAAGA CCCAGAGGAT GCTGAGCGGA  
 TTCTGCCCCG ACAAGGTCTC AGCTGGGCAG TTTTCCAGCT TGCATGTCCG AGACACCAAA  
 ATCGAGGTGG CCCAGTTTGT AAAGGACCTG CTCTTACATT TAAAGAACT TTTTCGCGAG  
 GGACGGTTCA ACGAGTCCAA ATATGGTCCC CCATGCCAC CATGCCAGC ACCTGAGTTC  
 CTGGGGGGAC CATCAGTCTT CCTGTTCACC CCAAACCCA AGGACACTCT CATGATCTCC  
 CGGACCCCTG AGGTCAAGTG CGTGGTGGTG GACGTGAGCC AGGAAGACCC CGAGGTCCAG  
 TTCAACTGGT ACGTGGATGG CGTGGAGGTG CATAATGCCA AGACAAAGCC GCGGGAGGAG  
 CAGTTCAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC GTCCTCACCG TCCTGCACCA GGAAGTGGCTG  
 AACGGCAAGG AGTACAAGTG CAAGGTCTCC AACAAAGGCC TCCCGTCTC CATCGAGAAA  
 ACCATCTCCA AAGCCAAAGG GCAGCCCCGA GAGCCACAGG TGTACACCCT GCCCCATCC  
 CAGGAGGAGA TGACCAAGAA CCAGGTGAGC CTGACCTGCC TGGTCAAAG CTTCTACCCC  
 AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAT GGGCAGCCGG AGAACAACTA CAAGACCAGC  
 CCTCCCGTGC TGGACTCCGA CGGCTCCTC TTCCTCTACA GCAGGCTAAC CGTGGACAAG  
 AGCAGGTGGC AGGAGGGGAA TGTCTTCTCA TGCTCCGTGA TGCATGAGCC TCTGCACAAC  
 CACTACACAC AGAAGAGCCT CTCCCTGTCC CTAGGTAAA TGTTTTGGGT GCTGGTGGTG  
 GTTGGTGGAG TCCTGGCTTG CTATAGCTTG CTAGTAACAG TGGCCTTTAT TATTTTCTGG  
GTGAGGAGTA AGAGGAGCAG GGGCGGACAC AGTGAAGTACA TGAACATGAC TCCCGCCCGC  
CCTGGGCCCCA CCCGCAAGCA TTACCAGCCC TATGCCCCAC CACCGGACTT CGCAGCCGGA  
 GGTGGCGGAG GTGGCAAACG GGGCAGAAAG AACTCCTGT ATATATTCAA ACAACCATTY  
 ATGAGACCAG TACAACACTAC TCAAGAGGAA GATGGCTOTA GCTGCCGATT TCCAGAAGAA  
 GAAGAAGGAG GATGTGAAGT GGGAGGTGGC AGAGTGAAGT TCAGCAGGAG CGCAGACGCC  
 CCCCGTACC AGCAGGGCCA GAACCAGCTC TATAACGAGC TCAATCTAGG ACGAAGAGAG  
 GAGTACGATG TTTTGGACAA GAGACGTGGC CGGACCCCTG AGATGGGGGG AAAGCCGAGA  
 AGGAAGAACC CTCAGGAAGG CCTGTACAAT GAACTGCAGA AAGATAAGAT GGCGGAGGCC  
 TACAGTGAGA TTGGGATGAA AGGCGAGCGC CGGAGGGGCA AGGGGCACGA TGGCCTTTAC  
 CAGGGTCTCA GTACAGCCAC CAAGGACACC TACGACGCC TTCACATGCA GGCCCTGCCC  
 CCTCGCTGA (SEQ ID NO: 40)