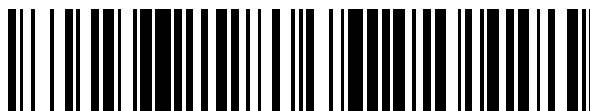


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 705**

51 Int. Cl.:

C07K 14/715 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

C07K 14/73 (2006.01)

C07K 14/725 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/867 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 35/17 (2015.01)

C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.09.2015 PCT/US2015/051089**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.03.2016 WO16044811**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.09.2015 E 15775539 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 3194433**

54 Título: **Linfocitos T de receptor de antígeno quimérico coestimulante que se dirigen a IL13R 2**

30 Prioridad:

19.09.2014 US 201462053068 P

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

24.01.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BROWN, CHRISTINE E. y
FORMAN, STEPHEN J.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 738 705 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

Linfocitos T de receptor de antígeno quimérico coestimulante que se dirigen a IL13R 2

Antecedentes

Se han investigado inmunoterapias basadas en linfocitos T específicos de tumor, que incluyen terapias que emplean linfocitos T manipulados, para el tratamiento antitumoral. En algunos casos, los linfocitos T usados en dichas terapias no siguen activos *in vivo* durante un periodo suficiente. En algunos casos, la especificidad de tumor de los linfocitos T es relativamente baja. Por tanto, existe la necesidad en la materia de terapias contra el cáncer específicas de tumor con funcionamiento antitumoral a largo plazo.

Los gliomas malignos (GM), que incluyen astrocitoma anaplásico (AA-grado III) y glioblastoma (GBM-grado IV), tienen una tasa de incidencia de aproximadamente 20.000 nuevos casos diagnosticados anualmente en los Estados Unidos. Según la Asociación Americana de Tumores Cerebrales, la prevalencia total de individuos que viven con un tumor maligno cerebral, basándose en los datos del censo de 2010 de Estados Unidos, es aproximadamente 140.000 personas. Aunque el GM es una enfermedad rara, es altamente agresiva y heterogénea con respecto a su comportamiento maligno y casi uniformemente letal. Las actuales terapias de referencia para GM de gran malignidad solo dan beneficios a corto plazo, y estos tumores cerebrales son prácticamente incurables. De hecho, incluso con las modernas técnicas quirúrgicas y radioterapéuticas, que frecuentemente agravan las morbilidades ya graves impuestas por la localización en el sistema nervioso central (SNC), las tasas de supervivencia de 5 años son bastante bajas. Además, para la mayoría de pacientes que recaen de la enfermedad, existen algunas opciones terapéuticas. Así, existe una significativa necesidad de terapias más eficaces, particularmente para los pacientes que han recaído / progresado siguiendo las terapias de vanguardia, y se garantiza la participación de esta población de pacientes en ensayos clínicos.

La terapia adoptiva de linfocitos T (ACT) utilizando linfocitos T manipulados de receptor de antígeno quimérico (CAR) puede proporcionar una forma segura y eficaz para reducir las tasas de reaparición de GM, puesto que los linfocitos T de CAR se pueden manipular para reconocer específicamente poblaciones de tumores antigénicamente distintas (Cartellieri et al. 2010 J Biomed Biotechnol 2010:956304; Ahmed et al. 2010 Clin Cancer Res 16:474; Sampson et al. 2014 Clin Cancer Res 20:972; Brown et al. 2013 Clin Cancer Res 2012 18:2199; Chow et al. 2013 Mol Ther 21:629), y los linfocitos T pueden migrar a través del parénquima cerebral para dirigirse a y destruir células malignas infiltrantes (Hong et al. 2010 Clin Cancer Res 16:4892; Brown et al. 2007 J Immunol 179:3332; Hong et al. 2010 Clin Cancer Res 16:4892; Yaghoubi 2009 Nat Clin Pract Oncol 6:53). Estudios preclínicos han demostrado que los linfocitos T de CAR+ que se dirigen a IL13R α 2 presentan potente actividad citolítica específica de IL13R α 2 independiente del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) contra tanto células de tipo células madre como células de glioma diferenciadas, e inducen la regresión de los xenoinjertos *in vivo* de glioma establecidos (Kahlon et al. 2004 Cancer Res 64:9160; Brown et al. 2012 Clin Cancer Res 18:2199). Kong S et al. describen en Clin Cancer Res, vol. 18, no. 21, de 1 noviembre de 2012 en las páginas 5949-5960, la supresión de xenoinjertos de glioma humano con linfocitos T modificados con receptor de antígeno quimérico específico de IL13R de segunda generación. Jonnalagadda M et al. describen en Journal for Immunotherapy of Canc vol. 1, N° Supl. 1, 7 de noviembre de 2013 en la página P18, que los receptores de antígeno quimérico que incorporan mutaciones en la región Fc de espaciador de IgG4 para eliminar el reconocimiento de receptor de Fc da como resultado la persistencia mejorada de linfocitos T de CAR y eficacia antitumoral. El documento WO 2010/025177 A1 describe que la integración de los dominios de señalización coestimulantes dentro de un receptor de antígeno quimérico que se dirige a tumor, tal como la IL13-zetakina específica de IL13R α 2, potencia las respuestas mediadas por linfocitos T contra tumores incluso en ausencia de ligandos expresados para receptores coestimulantes.

Sumario

La presente invención se define por las reivindicaciones independientes. Las reivindicaciones dependientes representan otras realizaciones de la invención.

En el presente documento se describen inmunorreceptores de transmembrana quiméricos (receptores de antígeno quimérico o "CARs") que comprenden un dominio extracelular, una región transmembrana y un dominio de señalización intracelular. El dominio extracelular está constituido por un ligando de IL-13 que se une a interleucina-13R α 2 (IL13R α 2) y, opcionalmente, un espaciador, que comprende, por ejemplo un dominio Fc de porción huma. La porción transmembrana incluye un dominio transmembrana CD4, un dominio transmembrana CD8, un dominio transmembrana CD28, un dominio transmembrana CD3 o un dominio transmembrana 4-1BB. El dominio de señalización intracelular incluye el dominio de señalización de la cadena zeta del complejo CD3 humano (CD3 ζ) y uno o más dominios coestimulantes, por ejemplo, un dominio coestimulante 4-1BB. El dominio extracelular permite que CAR, cuando se expresa sobre la superficie de un linfocito T, dirija la actividad de linfocitos T a las células que expresan IL13R α 2, un receptor expresado en la superficie de células tumorales, que incluye glioma. Y, lo que es más importante, la porción de unión de IL13R α 2 del CAR incluye una modificación de aminoácidos, tal como una mutación E13Y, que aumenta la especificidad de unión. La inclusión de un dominio coestimulante, tal como el dominio coestimulante 4-1BB (CD137) en series con CD3 ζ en la región intracelular permite que el linfocito T reciba señales coestimulantes. Los linfocitos T, por ejemplo, linfocitos T autólogos específicos de paciente, se pueden

manipular para expresar los CARs descritos en el presente documento y se pueden expandir las células manipuladas y usar en ACT. Se pueden usar diversos subconjuntos de linfocitos T. Además, el CAR se puede expresar en otras células inmunitarias tales como linfocitos NK. Si un paciente se trata con una célula inmunitaria que expresa un CAR descrito en el presente documento, la célula puede ser un linfocito T autólogo o alogeno. En algunos casos, las células usadas son linfocitos T de memoria central CD4⁺ y CD8⁺ (T_{CM}), que son CD45RO⁺CD62L⁺, y el uso de dichas células puede mejorar la persistencia a largo plazo de las células después de la transferencia adoptiva en comparación con el uso de otros tipos de linfocitos T específicos de paciente.

En el presente documento se describe una molécula de ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el receptor de antígeno quimérico comprende: IL-13 humana o una variante de la misma que tiene 1-10 (por ejemplo, 1 o 2) modificaciones de aminoácidos; un dominio transmembrana seleccionado de: un dominio transmembrana CD4 o variante del mismo que tiene 1-10 (por ejemplo, 1 o 2) modificaciones de aminoácidos, un dominio transmembrana CD8 o variante del mismo que tiene 1-10 (por ejemplo, 1 o 2) modificaciones de aminoácidos, un dominio transmembrana CD28 o una variante del mismo que tiene 1-10 (por ejemplo, 1 o 2) modificaciones de aminoácidos, y un dominio transmembrana CD3ζ o una variante del mismo que tiene 1-10 (por ejemplo, 1 o 2) modificaciones de aminoácidos; un dominio coestimulante; y dominio de señalización CD3ζ o una variante del mismo que tiene 1-10 (por ejemplo, 1 o 2) modificaciones de aminoácidos.

En diversos ejemplos, el dominio coestimulante se selecciona del grupo que consiste en: un dominio coestimulante CD28 o una variante del mismo que tiene 1-10 (por ejemplo, 1 o 2) modificaciones de aminoácidos, un dominio coestimulante 4-1BB o una variante del mismo que tiene 1-10 (por ejemplo, 1 o 2) modificaciones de aminoácidos y un dominio coestimulante OX40 o una variante del mismo que tiene 1-10 (por ejemplo, 1 o 2) modificaciones de aminoácidos. En ciertos ejemplos, un dominio coestimulante 4-1BB o una variante del mismo que tiene 1-10 (por ejemplo, 1 o 2) modificaciones de aminoácidos si está presente.

En algunas realizaciones: la molécula de ácido nucleico expresa un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 10; el receptor de antígeno quimérico comprende una región IL-13/IgG4/CD4t/4-1BB que comprende el aminoácido de SEQ ID NO: 11 y un dominio de señalización CD3ζ que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; y el receptor de antígeno quimérico comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOs: 10.

También se desvela una población de linfocitos T humanos transducidos por un vector que comprende un casete de expresión que codifica un receptor de antígeno quimérico, en donde el receptor de antígeno quimérico comprende: IL-13 humana o una variante de la misma que tiene 1-10 modificaciones de aminoácidos; un dominio transmembrana seleccionado de: un dominio transmembrana CD4 o variante del mismo que tiene 1-10 modificaciones de aminoácidos, un dominio transmembrana CD8 o variante del mismo que tiene 1-10 modificaciones de aminoácidos, un dominio transmembrana CD28 o una variante del mismo que tiene 1-10 modificaciones de aminoácidos, y un dominio transmembrana CD3ζ o una variante del mismo que tiene 1-10 modificaciones de aminoácidos; un dominio coestimulante; y dominio de señalización CD3ζ de una variante del mismo que tiene 1-10 modificaciones de aminoácidos.

También se describe una composición para su uso en el tratamiento de cáncer en un paciente que comprende administrar una población de linfocitos T humanos autólogos o alogenos (por ejemplo, linfocitos T autólogos o alogenos que comprenden células T_{cm}, por ejemplo, al menos 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % de las células son células T_{cm}; al menos 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 % de las células T_{cm} son CD4⁺ y al menos 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 % de las células T_{cm} son células CD8⁺) transducidos por un vector que comprende un casete de expresión que codifica un receptor de antígeno quimérico, en donde el receptor de antígeno quimérico comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 10, 31-48 y 52. En diversas realizaciones: la población de linfocitos T humanos comprende linfocitos T de memoria central; el cáncer es glioblastoma; y los linfocitos T humanos transducidos se prepararon por un método que comprende obtener linfocitos T del paciente, tratar los linfocitos T para aislar linfocitos T de memoria central, y transducir al menos una porción de los linfocitos de memoria central con un vector viral que comprende un casete de expresión que codifica un receptor de antígeno quimérico, en donde el receptor de antígeno quimérico comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 10.

También se describe: una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NOs: 10, 31-48 y 52; una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 10, 31-48 y 52, excepto por la presencia de no más de 5 sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos; una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NOs: 10, 31-48 y 52, excepto por la presencia de no más de 5 sustituciones de aminoácidos; y una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NOs: 10, 31-48 y 52, excepto por la presencia de no más de 2 sustituciones de aminoácidos.

Ciertos CAR descritos en el presente documento, por ejemplo, el CAR de IL13(EQ)BB ζ y el CAR de IL13(EQ)CD28-BB ζ , tienen ciertas características beneficiosas en comparación con ciertos otros CAR dirigidos a IL13. Por ejemplo, tienen selectividad mejorada por IL13R α , provocan mejor producción de citocinas Th2, particularmente menor producción de IL13.

- 5 Los linfocitos T que expresan un CAR que se dirige a IL13R α 2 pueden ser útiles en el tratamiento de cánceres tales como glioblastoma, así como otros cánceres que expresan IL13R α 2 que incluyen, pero no se limitan a, meduloblastoma, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, cáncer de ovario y sarcoma de Kaposi. Así, la presente divulgación incluye composiciones para su uso en el tratamiento de cáncer usando linfocitos T que expresan un CAR descrito en el presente documento.
- 10 La presente divulgación también moléculas de ácidos nucleicos que codifican cualquiera de los CARs descritos en el presente documento (por ejemplo, vectores que incluyen una secuencia de ácidos nucleicos que codifica uno de los CARs) y linfocitos T aislados que expresan cualquiera de los CARs descritos en el presente documento.

Los CAR descritos en el presente documento pueden incluir una región de espaciador situada entre el dominio de IL13 y el dominio transmembrana. Se puede usar una variedad de diferentes espaciadores. Algunos de ellos incluyen al menos la porción de una región Fc humana, por ejemplo una porción de bisagra de una región Fc humana o un dominio CH3 o sus variantes. La Tabla 1 a continuación proporciona diversos espaciadores que se pueden usar en los CARs descritos en el presente documento.

15

Tabla 1: Ejemplos de espaciadores

Nombre	Longitud	Secuencia
a3	3 aa	AAA
conector	10 aa	GGGSSGGGSG (SEQ ID NO: 14)
bisagra de IgG4 (S $\rightarrow$ P) (S228P)	12 aa	ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO: 15)
bisagra de IgG4	12 aa	ESKYGPPCPSCP (SEQ ID NO: 52)
bisagra de IgG4 + conector	22 aa	ESKYGPPCPPCPGGGSSGGGSG (SEQ ID NO: 16)
bisagra de CD28	39 aa	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHL CPSPLFPGPSKP (SEQ ID NO:17)
bisagra de CD8-48 aa	48 aa	AKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE ACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO:18)
bisagra de CD8-45 aa	45aa	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACR PAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO:19)
IgG4(HL-CH3)	129 aa	ESKYGPPCPPCPGGGSSGGGSGGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO:20)

Nombre	Longitud	Secuencia
IgG4(L235E, N297Q)	229 aa	ESKYGPPCPCPAPEFEGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHQAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO:4)
IgG4(S228P, L235E, N297Q)	229 aa	ESKYGPPCPCPAPEFEGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHQAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO:51)
IgG4(CH3)	107 aa	GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSL LGK (SEQ ID NO:50)

Algunas regiones de espaciador incluyen toda o parte de una región bisagra de la inmunoglobulina (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), es decir, la secuencia que se encuentra entre los dominios CH1 y CH2 de una inmunoglobulina, por ejemplo, una bisagra de Fc de IgG4 o una bisagra de CD8. Algunas regiones de espaciador incluyen un dominio CH3 de inmunoglobulina o tanto un dominio CH3 como un dominio CH2. Las secuencias derivadas de inmunoglobulina pueden incluir una o más modificaciones de aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones, por ejemplo, sustituciones que reducen la unión inespecífica.

Una "modificación de aminoácidos" se refiere a una sustitución, inserción y/o delección de aminoácidos en una secuencia de proteínas o péptidos. Una "sustitución de aminoácidos" o "sustitución" se refiere a la sustitución de un aminoácido en una posición particular en una secuencia de péptidos o proteínas original con otro aminoácido. Se puede hacer una sustitución para cambiar un aminoácido en la proteína resultante en un modo no conservativo (es decir, cambiando el codón de un aminoácido que pertenece a una agrupación de aminoácidos que tiene un tamaño o característica particular a un aminoácido que pertenece a otra agrupación) o en un modo conservativo (es decir, cambiando el codón de un aminoácido que pertenece a una agrupación de aminoácidos que tiene un tamaño o característica particular a un aminoácido que pertenece a la misma agrupación). Dicho cambio conservativo conduce generalmente a menos cambio en la estructura y función de la proteína resultante. Lo siguiente son ejemplos de diversas agrupaciones de aminoácidos: 1) Aminoácidos con grupos R no polares: Alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, triptófano, metionina; 2) Aminoácidos con grupos R polares sin carga: Glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina; 3) Aminoácidos con grupos R con carga polar (negativamente cargados a pH 6,0): Ácido aspártico, ácido glutámico; 4) Aminoácidos básicos (positivamente cargados a pH 6,0): Lisina, arginina, histidina (a pH 6,0). Otra agrupación puede ser los aminoácidos con grupos fenilo: Fenilalanina, triptófano y tirosina.

El primer aminoácido en el espaciador IgG4(L235E, N297Q) en la Tabla 1 es 219 y el primer aminoácido en el espaciador IgG4(HL-CH3) en la Tabla 1 es 219 ya que es el primer aminoácido en la secuencia de bisagra de IgG y la secuencia del conector de bisagra de IgG4 (HL) en la Tabla 1

Para posiciones de aminoácidos en la inmunoglobulina tratada en el presente documento, la numeración es según el índice EU o el esquema de numeración EU (Kabat et al. 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, incorporado por este documento

completamente como referencia). El índice EU o índice EU como en el esquema de numeración de Kabat o EU se refiere a la numeración de EU Antibody (Edelman et al. 1969 Proc Natl Acad Sci USA 63:78-85).

Se puede usar una variedad de dominios transmembrana en CAR dirigidos contra IL13Ra2. La Tabla 2 incluye ejemplos de dominios transmembrana adecuados. Si un dominio de espaciador está presente, el dominio transmembrana se localiza en el extremo carboxi con respecto al dominio de espaciador.

Tabla 2: Ejemplos de dominios transmembrana

Nombre	Acceso	Longitud	Secuencia
CD3z	J04132.1	21 aa	LCYLLDGILFIYGVILTALFL (SEQ ID NO: 21)
CD28	NM_006139	27 aa	FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO: 22)
CD28(M)	NM_006139	28 aa	MFWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO: 22)
CD4	M35160	22 aa	MALIVLGGVAGLLLFIGLGIFF (SEQ ID NO: 5)
CD8tm	NM_001768	21 aa	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT (SEQ ID NO: 23)
CD8tm2	NM_001768	23 aa	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY (SEQ ID NO: 24)
CD8tm3	NM_001768	24 aa	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO: 25)
41BB	NM_001561	27 aa	IISFFLALTSTALLFLFF LTLRFSV (SEQ ID NO: 26)

Muchas de los CAR descritos en el presente documento incluyen uno o más (por ejemplo, dos) dominios coestimulantes. El (Los) dominio(s) coestimulante(s) se sitúan entre el dominio transmembrana y el dominio de señalización CD3ζ. La Tabla 3 incluye ejemplos de dominios coestimulantes adecuados junto con la secuencia del dominio de señalización CD3ζ.

Tabla 3: Ejemplos de dominios coestimulantes

Nombre	Acceso	Longitud	Secuencia
CD3ζ	J04132.1	113 aa	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR
			GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL PPR
CD28	NM_006139	42 aa	RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQ PYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO: 27)
CD28gg*	NM_006139	42 aa	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHY QPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO:28)
41BB	NM_001561	42 aa	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO:29)
OX40		42 aa	ALYLLRRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQ EEQADAHSTLAKI (SEQ ID NO:30)

Descripción de dibujos

La **Figura 1** es una representación esquemática de CAR de IL13(E13Y)-zetakina (izquierda) compuesto de la variante de IL-13 humana específica de IL13Ra2 (huIL-13(E13Y)), espaciador de Fc de IgG4 humana (huγ₄Fc), transmembrana CD4 humana (huCD4 tm) y porciones citoplásmicas de la cadena CD3ζ humana (huCD3ζ cit) como se indica. También se representa un CAR de IL13(EQ)BBζ que es el mismo que IL13(E13Y)-zetakina con la excepción de las dos mutaciones puntuales, L235E y N297Q indicadas en rojo, que se sitúan en el dominio CH2 del espaciador de IgG4, y la adición de un dominio citoplásmico coestimulante 4-1BB (4-1BB cit).

Las **Figuras 2A-C** representan ciertos vectores y marcos de lectura abiertos. **A** es un diagrama del marco de lectura abierto de ADNc de la construcción IL13(EQ)BBZ-T2ACD19t de 2670 nucleótidos, donde se indican el ligando específico de IL13R α 2 IL13(E13Y), dominios de bisagra de Fc de IgG4(EQ), transmembrana CD4, de señalización citoplásmica de 4-1BB, de conector de tres glicinas y de señalización citoplásmica CD3 ζ del CAR de IL13(EQ)BBZ, así como las secuencias de salto de ribosoma T2A y de CD19 truncado. También se indican el receptor alfa de GM-CSF humano y las secuencias señal de CD19 que conducen la expresión superficial del CAR de IL13(EQ)BBZ y CD19t. **B** es un diagrama de las secuencias flanqueadas por repeticiones terminales largas (indicadas por 'R') que se integrarán en el genoma hospedador. **C** es un mapa del plásmido IL13(EQ)BBZ-T2A-CD19t_epHIV7.

La **Figura 3** representa la construcción de pHIV7.

La **Figura 4** representa los elementos de pHIV7.

La **Figura 5** representa un esquema de producción para T_{CM} IL13(EQ)BBZ/CD19t+.

Las **Figuras 6A-C** representan los resultados del análisis de citometría de flujo de la expresión de marcadores de transgenes superficiales y de linfocitos T. Se co-tiñeron T_{CM} IL13(EQ)BBZ/CD19t+ HD006.5 y HD187.1 con anti-IL13-PE y anti-CD8-FITC para detectar células de CAR+ CD8+ y CAR+ CD4+ (es decir, CD8 negativas) (**A**), o anti-CD19-PE y anti-CD4-FITC para detectar células CAR+ CD4+ CD19t+ y CD8+ (es decir, CD4 negativas) (**B**). Se tiñeron T_{CM} IL13(EQ)BBZ/CD19t+ HD006.5 y HD187.1 con anti-CD3, TCR, CD4, CD8, CD62L y CD28 conjugados con fluorocromo (histogramas grises) o controles de isotipo (histogramas negros) (**C**). En todos los casos los porcentajes basados en linfocitos viables (DAPI negativo) tiñeron el isotipo anterior.

Las **Figuras 7A-B** representan la caracterización funcional *in vitro* de la función efectora específica de IL13R α 2 de T_{CM} IL13(EQ)BBZ+. Se usaron T_{CM} IL13(EQ)BBZ/CD19t+ HD006.5 y HD187.1 como efectores en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr de 6 horas usando una relación 10:1 de E:D basada en la expresión de CD19t. Se manipularon con K562 las dianas de tumor IL13R α 2-positivas para expresar IL13R α 2 (K562-IL13R α 2) y la línea de glioma primario PBT030-2, y el control de dianas de tumor IL13R α 2-negativas fue la línea parental K562 (**A**). Se evaluaron T_{CM} IL13(EQ)BBZ/CD19t+ HD006.5 y HD187.1 para la producción de citocinas dependientes de antígeno siguiendo el cultivo durante la noche a una relación 10:1 de E:D con dianas IL13R α 2-positivas y negativas. Se midieron los niveles de citocinas usando el kit de ensayo de citocinas humanas TH1/TH2 de Bio-Plex Pro y se informan INF- γ (**B**).

Las **Figuras 8A-C** representan el resultado de estudios que demuestran la regresión de xenoinjertos de tumor de glioma establecidos después de la transferencia adoptiva de T_{CM} IL13(EQ)BBZ/CD19t+. Se implantaron estereotácticamente células tumorales PBT030-2 EGFP-ffLuc+ (1×10^5) en el prosencéfalo derecho de ratones NSG. En el día 5, los ratones recibieron o bien 2×10^6 T_{CM} IL13(EQ)BBZ/CD19t+ ($1,1 \times 10^6$ CAR+; n=6), 2×10^6 T_{CM} simuladas (sin CAR; n=6) o bien PBS (n=6). Ratones representativos de cada grupo que muestran carga tumoral relativa usando Xenogen Living Imagen (**A**). La cuantificación de flujo de ffLuc (fotones/s) muestra que T_{CM} IL13(EQ)BBZ/CD19t+ induce la regresión tumoral en comparación con T_{CM} transducidas con vector vacío y PBS (#p<0,02, *p<0,001, ANOVA de medidas repetidas) (**B**). Curva de supervivencia de Kaplan Meier (n=6 por grupo) que demuestra supervivencia significativamente mejorada (p=0,0008; prueba del orden logarítmico) para ratones tratados con T_{CM} IL13(EQ)BBZ/CD19t+ (**C**).

Las **Figuras 9A-C** representan los resultados de estudios que comparan la eficacia antitumoral de T_{CM} IL13(EQ)BBZ y clones de CTL IL13-zetakina. Se implantaron estereotácticamente TSs de PBT030-2 EGFP-ffLuc+ (1×10^5) en el prosencéfalo derecho de ratones NSG. En el día 8, los ratones recibieron o bien $1,6 \times 10^6$ de T_{CM} simuladas (sin CAR), $1,0 \times 10^6$ T_{CM} CAR+ IL13(EQ)BBZ ($1,6 \times 10^6$ linfocitos T totales; 63 % CAR), $1,0 \times 10^6$ CTL CD8+ IL13-zetakina cl. 2D7 (CAR+ clonal), o sin tratamiento (n=6 por grupo). Ratones representativos de cada grupo que muestran carga tumoral relativa usando Xenogen Living Imagen (**A**). Líneas de regresión lineal del logaritmo natural del flujo de ffLuc (fotones/s) con el tiempo, los valores de p son para el grupo por comparaciones de interacción temporal (**B**). Los análisis de supervivencia de Kaplan Meier (n= 6 por grupo) demuestran supervivencia significativamente mejorada (p=0,02; prueba del orden logarítmico) para ratones tratados con T_{CM} IL13(EQ)BBZ en comparación con CTL CD8+ IL13-zetakina cl. 2D7 (**C**).

Las **Figuras 10A-C** representan los resultados de estudios que comparan la eficacia antitumoral de T_{CM} IL13(EQ)BBZ y clones de CTL IL13-zetakina. Se implantaron estereotácticamente TSs de PBT030-2 EGFP-ffLuc+ (1×10^5) en el prosencéfalo derecho de ratones NSG. En el día 8, los ratones recibieron o bien $1,3 \times 10^6$ de T_{CM} simuladas (sin CAR; n=6), 1,0, 0,3 o $0,1 \times 10^6$ T_{CM} CAR+ IL13(EQ)BBZ (78 % de CAR+; n=6-7), 1,0, 0,3 o $0,1 \times 10^6$ CTL CD8+ IL13-zetakina cl. 2D7 (CAR+ clonal; n=6-7), o sin tratamiento (n=5). Obtención de imágenes xenógenas de ratones representativos de cada grupo que muestran carga tumoral relativa (**A**). Las líneas de regresión lineal del logaritmo natural del flujo de ffLuc (fotones/s) muestran que T_{CM} IL13(EQ)BBZ logra regresión tumoral superior en comparación con CTL IL13-zetakina cl. 2D7 de primera generación, T_{CM} simuladas y tumor solo (**B**). Flujo promedio por grupo en el día 27 después de la inyección tumoral que demuestra que la dosis de $0,1 \times 10^6$ T_{CM} IL13(EQ)BBZ supera la dosis de $1,0 \times 10^6$ diez veces mayor de CTL CD8+ IL13-zetakina cl. 2D7 (p = 0,043; prueba de la t de Welch de dos muestras) (**C**).

La **Figura 11** representa los resultados de estudios que demuestran que Tcm IL13(EQ)BBζ muestran persistencia mejorada en comparación con clones de CTL IL13-zetakina. La inmunohistoquímica de CD3 evalúa la persistencia de linfocitos T en el sitio tumoral 7 días después de la infusión de linfocitos T. Se detectan números significativos de linfocitos T para Tcm IL13(EQ)BBζ (panel superior). Por el contrario, se detectan muy pocos linfocitos T CD3+ IL13-zetakina viables (panel inferior).

Las **Figuras 12A-D** representan los resultados de experimentos que comparan la vía de administración de linfocitos T de CAR+ (i.c. frente a i.v.) para grandes tumores establecidos. Se implantaron TSs de PBT030-2 EGFP-ffLuc+ (1×10^5) en el prosencéfalo derecho de ratones NSG. En los días 19 y 26, los ratones se inyectaron i.v. a través de la vena de la cola con o bien 5×10^5 Tcm de CAR+ IL13(EQ)BBζ+ ($11,8 \times 10^6$ células totales; n=4), o Tcm simuladas ($11,8 \times 10^6$ células; n=4). Alternativamente, en los días 19, 22, 26 y 29, los ratones se inyectaron i.c. con o bien 1×10^6 Tcm de CAR+ IL13(EQ)BBζ+ ($2,4 \times 10^6$ células totales; n=4), o Tcm simuladas ($2,4 \times 10^6$ células; n=5). El flujo de ffLuc promedio (fotones/s) con el tiempo muestra que Tcm IL13(EQ)BBζ administrados i.c. median en la regresión tumoral de tumores de día 19. Por comparación, linfocitos T administrados i.v. no muestran reducción en la carga tumoral en comparación con los controles de Tcm no tratados o simuladas (**A**). La curva de supervivencia de Kaplan Meier demuestra la mejorada supervivencia para ratones tratados con Tcm IL13(EQ)BBZ i.c. en comparación con ratones tratados con Tcm de CAR+ administrados i.v. ($p = 0,0003$, prueba del rango logarítmico) (**B**). H&E representativa y IHC de CD3 de ratones tratados i.v. (**C**) frente a i.c. (**D**) con Tcm IL13(EQ)BBZ+. Solo se detectaron linfocitos T CD3+ en el grupo tratado i.c., sin detectarse células CD3+ en el tumor o parénquima cerebral circundante para ratones tratados i.v.

Las **Figuras 13A-B** representan los resultados de estudios que muestran que el linfocito T de CAR+ inyectado intracranalmente, bien intratumoral (i.c.t.) o intraventricular (i.c.v.), puede circular a tumores en el hemisferio opuesto. Se implantaron estereotácticamente TSs de PBT030-2 EGFP-ffLuc+ (1×10^5) en los prosencéfalos derecho e izquierdo de ratones NSG. En el día 6, los ratones se inyectaron i.c. en el sitio tumoral derecho con $1,0 \times 10^6$ Tcm IL13(EQ)BBζ+ ($1,6 \times 10^6$ células totales; 63 % CAR; n=4). Esquema del modelo experimental de glioma multifocal (**A**). IHC de CD3 que muestra la infiltración de linfocitos T tanto en los sitios tumorales derechos como izquierdos (**B**).

Las **Figuras 14A-C** representan los resultados de una serie de estudios que evalúan los dominios coestimulantes de CAR específico de IL13Rα2. Esquema de construcciones de CAR específicas de IL13Rα2 que comparan diversos dominios de endo/señalización intracelular, que incluyen el CAR de CD3z de primera generación que carece de coestimulación, frente a los CARs de segunda generación que incorporan o bien 4-1BB o bien CD28, frente a un CAR de tercera generación que contiene tanto CD28 como 4-1BB. Todos los casetes de CAR también contienen las secuencias de salto de ribosoma T2A y de CD19 truncado (CD19t) como marcador para células transducidas (**A**). Se transdujeron lentiviralmente Tcm de CD4 y CD8 y se enriquecieron inmunomagnéticamente linfocitos T que expresan CAR mediante anti-CD19. Niveles de expresión de CD19 e IL13 (es decir, CAR) como se miden por citometría de flujo (**B**). Se determinó la estabilidad de cada construcción de CAR dividiendo la intensidad media de fluorescencia (IMF) de CAR (IL13) entre la del marcador de transducción (CD19t) (**C**). Los CARs que contienen 4-1BB demostraron los niveles de expresión más bajos en comparación con el marcador de transducción de CD19t.

Las **Figuras 15A-B** representan los resultados de estudios que demuestran que CAR específico de IL13Rα2 que contiene el dominio coestimulante 4-1BB produce menos citocinas Th1 y Th2. Se determinó la capacidad de los linfocitos T transducidos con vector vacío o que expresan CAR indicados para destruir dianas de células tumorales PBT030-2 que expresan IL13Rα2 en un ensayo de liberación de ^{51}Cr de 4 horas en las relaciones efectoras:diana indicadas. Se representan el % medio de liberación de cromo + D.E. de pocillos triplicados (**A**). Como era de esperar, los linfocitos T transducidos con vector vacío no lisaron eficientemente las dianas. A diferencia, todos los linfocitos T que expresan CAR lisaron las células tumorales de una manera similar. Los linfocitos T transducidos con vector vacío o que expresan CAR indicados se co-cultivaron durante la noche con células tumorales PBT030-2 que expresan IL13Rα2 a una relación 10:1 y se analizaron los sobrenadantes para niveles de IL-13 y IFN-γ por matriz citométrica de perlas (**B**). Se presentan la media + D.E. de pocillos triplicados. De forma interesante, los linfocitos T que expresan los CARs de zeta, 41BB-zeta o CD28-41BB-zeta presentaron menor producción de citocinas estimuladas por antígeno que los linfocitos T que expresan el CAR de CD28-zeta.

Las **Figuras 16A-C** representan los resultados de una serie de estudios de la eficacia *in vivo* de CARs específicos de IL13Rα2. Ratones NSG recibieron una inyección intracraneal de células tumorales PBT030-2 ffLuc+ en el día 0, y se aleatorizaron en 6 grupos (n = 9-10 ratones por grupo) para el tratamiento i.c. con o bien PBS (Tumor solo), linfocitos T transducidos con vector vacío o linfocitos T que expresan el CAR específico de IL13Rα2 indicado en el día 8. Entonces se llevó a cabo la obtención de imágenes de bioluminiscencia cuantitativa para monitorizar el crecimiento tumoral con el tiempo. Imágenes de bioluminiscencia para ratones representativos en cada grupo (**A**). Media + E.E. de los niveles de flujo total de actividad de luciferasa con el tiempo en cada grupo (**B**). Niveles de flujo para cada ratón en el día 27. Todos los grupos tratados con linfocitos T de CAR específicos de IL13Rα2, excepto los tratados con linfocitos T que expresan CD28-CAR, muestran reducción estadísticamente significativa en el volumen del tumor en comparación con los ratones tratados con linfocitos T transducidos con vector vacío (**C**).

La **Figura 17** representa la secuencia de aminoácidos de IL13(EQ)BBζ/CD19t+ (SEQ ID NO: 10).

La **Figura 18** representa una comparación de secuencias de IL13(EQ)41BBζ[IL13(EQ)41BBζ T2A-CD19t_epHIV7; pF02630] (SEQ ID NO: 12) y CD19Rop_epHIV7 (pJ01683) (SEQ ID NO: 13).

La **Figura 19** representa la secuencia de aminoácidos de IL13(EmY)-CD8h3-CD8tm2-41BB Zeta (SEQ ID NO: 31 con péptido señal GMSCFRa; SEQ ID NO: 39 sin péptido señal GMSCFRa).

- 5 La **Figura 20** representa la secuencia de aminoácidos de IL13(EmY)-CD8h3-CD28tm-CD28gg-41BB-Zeta (SEQ ID NO: 32 con péptido señal GMSCFRa; SEQ ID NO: 40 sin péptido señal GMSCFRa).

La **Figura 21** representa la secuencia de aminoácidos de IL13(EmY)-IgG4(HL-CH3)-CD4tm-41BB-Zeta (SEQ ID NO: 33 con péptido señal GMSCFRa; SEQ ID NO: 41 sin péptido señal GMSCFRa).

- 10 La **Figura 22** representa la secuencia de aminoácidos de IL13(EmY)-IgG4(L235E,N297Q)-CD8tm-41BB-Zeta (SEQ ID NO: 34 con péptido señal GMSCFRa; SEQ ID NO: 42 sin péptido señal GMSCFRa).

La **Figura 23** representa la secuencia de aminoácidos de IL13(EmY)-Conector-CD28tm-CD28gg-41BB-Zeta (SEQ ID NO: 35 con péptido señal GMSCFRa; SEQ ID NO: 43 sin péptido señal GMSCFRa).

La **Figura 24** representa la secuencia de aminoácidos de IL13(EmY)-HL-CD28m-CD28gg-41BB-Zeta (SEQ ID NO: 36 con péptido señal GMSCFRa; SEQ ID NO: 44 sin péptido señal GMSCFRa).

- 15 La **Figura 25** representa la secuencia de aminoácidos de IL13(EmY)-IgG4(HL-CH3)-CD28tm-CD28gg-41BB-Zeta (SEQ ID NO: 37 con péptido señal GMSCFRa; SEQ ID NO: 45 sin péptido señal GMSCFRa).

La **Figura 26** representa la secuencia de aminoácidos de IL13(EmY) IgG4(L235E,N297Q)-CD28tm-CD28gg-41BB-Zeta (SEQ ID NO: 38 con péptido señal GMSCFRa; SEQ ID NO: 46 sin péptido señal GMSCFRa).

- 20 La **Figura 27** representa la secuencia de aminoácidos de IL13(EmY)-CD8h3-CD8tm-41BB Zeta (SEQ ID NO: 47 con péptido señal GMSCFRa; SEQ ID NO: 48 sin péptido señal GMSCFRa).

Descripción detallada

- A continuación se describe la estructura, construcción y caracterización de diversos receptores de antígeno quimérico específicos de IL13Rα2. Un antígeno quimérico (CAR) es una biomolécula recombinante que contiene, como mínimo, un dominio de reconocimiento extracelular, una región transmembrana y un dominio de señalización intracelular. El término "antígeno", por tanto, no se limita a moléculas que se unen a anticuerpos, sino a cualquier molécula que se puede unir específicamente a una diana. Por ejemplo, un CAR puede incluir un ligando que se une específicamente a un receptor de la superficie celular. El dominio de reconocimiento extracelular (también denominado el dominio extracelular o simplemente por el elemento de reconocimiento que lo contiene) comprende un elemento de reconocimiento que se une específicamente a una molécula presente sobre la superficie celular de una célula diana. La región transmembrana ancla el CAR a la membrana. El dominio de señalización intracelular comprende el dominio de señalización de la cadena zeta del complejo CD3 humano y opcionalmente comprende uno o más dominios de señalización coestimulantes. Los CARs se pueden tanto unir al antígeno como transducir la activación de linfocitos T, independiente de la restricción por MHC. Así, los CARs son inmunorreceptores "universales" que pueden tratar una población de pacientes con tumores de antígeno positivo independientemente de su genotipo de HLA. La inmunoterapia adoptiva usando linfocitos T que expresan un CAR específico de tumor puede ser una poderosa estrategia terapéutica para el tratamiento de cáncer.

- Un CAR específico de IL13Rα2 descrito en el presente documento se denomina IL13(EQ)BBζ. Este CAR incluye una variedad de características importantes que incluyen: un ligando de IL13α2 que tiene un cambio de aminoácido que mejora la especificidad de unión a IL13α2; el dominio de CD137 (4-1BB) en serie con CD3ζ para proporcionar coestimulación beneficiosa; y una región Fc de IgG4 que está mutada en dos sitios dentro de la región CH2 (L235E; N297Q) de un modo que reduce la unión por receptores de Fc (FcRs). Otros CARs descritos en el presente documento contienen un segundo dominio coestimulante.

- En algunos casos, los CAR descritos en el presente documento, que incluyen el CAR IL13(EQ)BBζ, se pueden producir usando un vector en el que el marco de lectura abierto del CAR va seguido por una secuencia de salto de ribosoma T2A y un CD19 truncado (CD19t), que carece de la cola de señalización citoplásmica (truncada en el aminoácido 323). En esta disposición, la co-expresión de CD19t proporciona un marcador superficial inerte no inmunogénico que permite la precisa medición de células modificadas por genes, y permite la selección positiva de células modificadas por genes, así como el eficiente tráfico de células y/u obtención de imágenes de los linfocitos T terapéuticos *in vivo* siguiendo transferencia adoptiva. La co-expresión de CD19t proporciona un marcador para el direccionamiento inmunológico de las células transducidas *in vivo* usando anticuerpos y/o reactivos de inmunotoxina clínicamente disponibles para deleccionar selectivamente las células terapéuticas, y así funcionar como un cambio suicida.

Los gliomas expresan receptores de IL13, y en particular, receptores de IL13 alta afinidad. Sin embargo, a diferencia del receptor de IL13, las células de glioma expresan en exceso una cadena de IL13Rα2 única capaz de unirse a

IL13 independientemente del requisito para IL4R β o γ c44. Al igual que su IL4 homólogo, IL13 tiene actividad inmunorreguladora pleotrópica fuera del SNC. Tanto IL13 como IL4 estimulan la producción de IgE por linfocitos B y suprimen la producción pro-inflamatoria de citocinas por macrófagos.

Estudios detallados usando autorradiografía con IL13 radiomarcada han demostrado la abundante unión de IL13 en casi todos los tejidos malignos de glioma estudiados. Esta unión es altamente homogénea dentro de secciones tumorales y en el análisis de células individuales. Sin embargo, el análisis con sonda molecular específico para ARNm de IL13R α 2 no detectó la expresión del receptor específico de glioma por elementos cerebrales normales y la autorradiografía con IL13 radiomarcada tampoco pudo detectar la unión de IL13 específica en el SNC normal. Estos estudios sugieren que el receptor de IL13R α 1/IL4 β / γ c compartido no se expresa detectablemente en el SNC normal. Por tanto, IL13R α 2 es una diana de la superficie celular muy específica y es una diana adecuada para un CAR diseñado para el tratamiento de un glioma.

La unión de moléculas terapéuticas basadas en IL13 al complejo de receptor IL13R α 1/IL4 β / γ c ampliamente expresado, sin embargo, tiene el potencial de mediar en toxicidades no deseadas a tejidos normales fuera del SNC, y así limita la administración sistémica de estos agentes. Una sustitución de aminoácidos en la hélice A de IL13-alfa en el aminoácido 13 de tirosina por el ácido glutámico nativo reduce selectivamente la afinidad de IL13 en el receptor IL13R α 1/IL4 β / γ c. La unión de este mutante (denominado IL13(E13Y)) a IL13R α 2, sin embargo, aumentó con respecto a IL13 no mutante. Así, este análogo de IL13 mínimamente alterado aumenta simultáneamente la especificidad y afinidad de IL13 por células de glioma. Por tanto, los CAR descritos en el presente documento incluyen una IL13 que contiene una mutación (E a Y o E a algún otro aminoácido tal como K o R o L o V) en el aminoácido 13 (según la numeración de Debinski et al. 1999 Clin Cancer Res 5:3143s). También se puede usar la IL13 que tiene la secuencia natural, sin embargo, y puede ser útil, particularmente en situaciones donde los linfocitos T modificados son localmente administrados, tal como por inyección directamente en una masa tumoral.

Los CAR descritos en el presente documento se pueden producir mediante cualquier medio conocido en la técnica, aunque preferentemente se producen usando técnicas de ADN recombinante. Se pueden preparar y ensamblar los ácidos nucleicos que codifican las diversas regiones del receptor quimérico en una secuencia codificante completa por técnicas convencionales de clonación molecular conocidas en la técnica (cribado de bibliotecas genómicas, PCR, ligación asistida por cebador, mutagénesis dirigida al sitio, etc.), según sea conveniente. La región codificante resultante se inserta preferentemente en un vector de expresión y se usa para transformar una línea de células hospedadoras de expresión adecuada, preferentemente una línea celular de linfocitos T, y lo más preferentemente una línea celular de linfocitos T autólogos.

Se pueden transducir diversos subconjuntos de linfocitos T aislados del paciente, que incluyen CMSP no seleccionadas o linfocitos T CD3 enriquecidos o subconjuntos de linfocito T CD3 o de memoria enriquecidos, con un vector para la expresión de CAR. Los linfocitos T de memoria central son un subconjunto útil de linfocitos T. Los linfocitos T de memoria central se pueden aislar de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) seleccionadas para células CD45RO+/CD62L+, usando, por ejemplo, el dispositivo CiniMACS® para seleccionar inmunomagnéticamente células que expresan los receptores deseados. Las células enriquecidas para linfocitos T de memoria central se pueden activar con anti-CD3/CD28, transducir con, por ejemplo, un vector lentiviral SIN que dirige la expresión de un CAR específico de IL13R α 2 (por ejemplo, IL13(EQ)BBZ) así como un CD19 humano truncado (CD19t), un marcador superficial no inmunogénico para tanto detección *in vivo* como posible selección *ex vivo*. Los linfocitos T de memoria central activados/genéticamente modificados se pueden expandir *in vitro* con IL-2/IL-15 y luego criopreservar.

Ejemplo 1: Construcción y estructura de un CAR específico de IL13R α 2

Se describe a continuación la estructura de un CAR específico de IL13R α 2 útil. La secuencia de CAR de codón optimizado contiene un ligando de IL-13 unido a membrana mutado en un único sitio (E13Y) para reducir la posible unión a IL13R α 1, un espaciador de Fc de IgG4 que contiene dos mutaciones (L235E; N297Q) que reducen enormemente los modelos de reconocimiento mediados por receptor de Fc, un dominio transmembrana CD4, un dominio de señalización citoplásmica coestimulante 4-1BB y un dominio de señalización citoplásmica CD3 ζ . Una secuencia de salto de ribosoma T2A separa esta secuencia de CAR de IL13(EQ)BBZ de CD19t, un marcador de detección/selección de la superficie celular inerte no inmunogénico. Este enlace de T2A da como resultado la expresión coordinada de tanto IL13(EQ)BBZ como CD19t a partir de un único transcrito. La **Figura 1A** es un dibujo esquemático del marco de lectura abierto de 2670 nucleótidos que codifica la construcción IL13(EQ)BBZ-T2ACD19t. En este dibujo, el ligando específico de IL13R α 2 IL13(E13Y), dominios Fc de IgG4(EQ), transmembrana CD4, de señalización citoplásmica 4-1BB, de conector de tres glicinas y de señalización citoplásmica CD3 ζ de CAR de IL13(EQ)BBZ, así como las secuencias de salto de ribosoma T2A y de CD19 truncado están todos indicados. También se indican el receptor alfa humano de GM-CSF y las secuencias señal de CD19 que conducen la expresión superficial de CAR de IL13(EQ)BBZ y CD19t. Así, la construcción IL13(EQ)BBZ-T2ACD19t incluye una secuencia de inmunorreceptor quimérico coestimulante optimizado en la bisagra específica de IL13R α 2 (designada IL13(EQ)BBZ), una secuencia de salto de ribosoma T2A y una secuencia de CD19t.

Se generó la secuencia de IL13(EQ)BBZ por fusión del péptido conductor alfa del receptor humano de GM-CSF con el ligando 5 de IL13(E13Y) bisagra de Fc de IgG4 modificada con L235E/N297Q (donde la mutación doble interfiere

con el reconocimiento de FcR), transmembrana CD4, dominio de señalización citoplásmica 4-1BB y secuencias del dominio de señalización citoplásmica CD3 ζ . Esta secuencia se sintetizó de novo después de la optimización de codón. Se obtuvo la secuencia de T2A de la digestión de un plásmido que contiene T2A. Se obtuvo la secuencia de CD19t a partir de la que abarca desde la secuencia de péptidos conductores hasta los componentes transmembrana (es decir, los pares de bases 1-972) de un plásmido que contiene CD19. Se cloraron los tres fragmentos, 1) IL13(EQ)BBZ, 2) T2A, y 3) CD19t, en el sitio de clonación múltiple del vector lentiviral epHIV7. Cuando se transfectoron en células apropiadas, el vector integra la secuencia representada esquemáticamente en la **Figura 1B** en el genoma de células hospedadoras. La **Figura 1C** proporciona un dibujo esquemático del propio plásmido IL13(EQ)BBZ-T2A-CD19t_epHIV7 de 9515 pares de bases.

Como se muestra esquemáticamente en la **Figura 2**, CAR de IL13(EQ)BBZ se diferencia en varios aspectos importantes de un CAR específico de IL13R α 2 previamente descrito denominado IL13(E13Y)-zetakina (Brown et al. 2012 Clinical Cancer Research 18:2199). IL13(E13Y)-zetakina está compuesto por la muteína de IL-13 humana específica de IL13R α 2 (huIL-13(E13Y)), espaciador de Fc de IgG4 humana (hu γ 4Fc), las porciones transmembrana CD4 humana (huCD4 tm) y de cadena citoplásmica humana CD3 ζ (huCD3 ζ cit) como se indica. A diferencia, IL13(EQ)BBZ tiene dos mutaciones puntuales, L235E y N297Q, que se sitúan en el dominio de CH2 del espaciador de IgG4, y un dominio citoplásmico coestimulante 4-1BB (4-1BB cit).

Ejemplo 2: Construcción y estructura de epHIV7 usado para la expresión de un CAR específico de IL13R α 2

El plásmido pHIV7 es el plásmido original del que derivó el vector clínico IL13(EQ)BBZ-T2A-CD19t_epHIV7 en el Laboratorio de Investigación Terapéutica de Linfocitos T (TCTRL) en City of Hope (COH). El vector epHIV7 usado para la expresión del CAR se produjo a partir del vector pHIV7. Y, lo que es más importante, este vector usa el promotor EF1 humano para conducir la expresión del CAR. Tanto las secuencias de 5' como de 3' del vector derivaron de pv653RSN, ya que previamente derivaron del provirus HXBc2. Las secuencias de flap de ADN del tramo de polipurina (cPPT) derivaron de la cepa pNL4-3 de HIV-1 del NIH AIDS Reagent Repository. Se describió previamente la secuencia del elemento regulador post-transcripcional (WPRE) de la marmota.

La construcción de pHIV7 se representa esquemáticamente en la Figura 3. Brevemente, se subclonó pv653RSN, que contiene 653 pb de gag-pol más repeticiones terminales largas (LTRs) de 5' y 3' con un gen de SL3-neomicina fosfotransferasa (Neo) intermedio, en pBluescript, del siguiente modo: En la etapa 1, las secuencias de 5' LTR para el elemento sensible a rev (RRE) hicieron p5'HIV-1 51, y luego se modificó 5' LTR retirando secuencias en la dirección 5' de la caja TATA, y se ligó primero a un potenciador de CMV y luego al origen de replicación de SV40 (p5'HIV-2). En la etapa 2, después de la clonación de 3' LTR en pBluescript para producir p3'HIV-1, se hizo una delección de 400 pb en el potenciador/promotor de 3' LTR para retirar elementos reguladores en cis en HIV U3 y formar p3'HIV-2. En la etapa 3, se ligaron los fragmentos aislados de p5'HIV-3 y p3'HIV-2 para producir pHIV-3. En la etapa 4, p3'HIV-2 se modificó adicionalmente retirando adicionalmente secuencias de HIV en la dirección 5' para generar p3'HIV-3 y se añadió un fragmento BamHI-Sall de 600 pb que contenía WPRE a p3'HIV-3 para producir p3'HIV-4. En la etapa 5, se redujo en tamaño por PCR pHIV-3 RRE y se ligó a un fragmento de 5' de pHIV-3 (no mostrado) y a p3'HIV-4, para producir pHIV-6. En la etapa 6, se amplificó a partir de pNL4-3 un fragmento de BglII-BamHI de 190 pb que contenía la secuencia de flap de ADN cPPT de HIV-1 pNL4-3 (55) y se situó entre las secuencias de RRE y WPRE en pHIV6 para producir pHIV-7. Este plásmido original pHIV7-GFP (GFP, proteína verde fluorescente) se usó para encapsidar el vector original usando un sistema de cuatro plásmidos.

Se requiere una señal de encapsidación, psi ψ , para la eficiente encapsidación del genoma viral en el vector. RRE y WPRE potencian el transporte del transcrito de ARN y la expresión del transgén. Se demostró que la secuencia de flap, en combinación con WPRE, potencia la eficiencia de transducción del vector lentiviral en las células de mamífero.

Las funciones auxiliares, requeridas para la producción del vector viral), se dividen en tres plásmidos separados para reducir la probabilidad de generación de lentivirus competente en la replicación mediante recombinación: 1) pCgp codifica la proteína gag/pol requerida para el ensamblaje de vectores virales; 2) pCMV-Rev2 codifica la proteína Rev, que actúa sobre la secuencia de RRE para ayudar en el transporte del genoma viral para la eficiente encapsidación; y 3) pCMV-G codifica la glucoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSV), que se requiere para la infectividad del vector viral.

Existe una homología de secuencia de ADN mínima entre el genoma de vector codificado por pHIV7 y los plásmidos auxiliares. Las regiones de homología incluyen una región de la señal de encapsidación de aproximadamente 600 nucleótidos, situada en la secuencia de gag/pol del plásmido auxiliar pCgp; una secuencia del promotor del CMV en los tres plásmidos auxiliares; y una secuencia de RRE en el plásmido auxiliar pCgp. Es altamente poco probable que el virus recombinante competente en la replicación se pueda generar debido a la homología en estas regiones, ya que requeriría múltiples eventos de recombinación. Además, cualquier recombinante resultante perdería secuencias funcionales de LTR y tat requeridas para la replicación lentiviral.

Se sustituyó el promotor del CMV por el promotor EF1 α -HTLV (EF1p), y el nuevo plásmido se denominó epHIV7 (**Figura 4**). EF1p tiene 563 pb y se introdujo en epHIV7 usando NruI y NheI, después de escindir el promotor del CMV.

5 Se ha retirado de este sistema el genoma lentiviral, excluyendo gag/pol y rev que son necesarios para la patogenicidad del virus no mutante y se requiere para la infección productiva de células diana. Además, la construcción de vector IL13(EQ)BBZ-T2ACD19t_epHIV7 no contiene un promotor intacto de 3'LTR, así el genoma proviral de ADN expresado y transcrito de forma inversa resultante en células dirigidas tendrá LTRs inactivas. Como resultado de este diseño, no se transcribirán secuencias derivadas de HIV-I del provirus y solo se expresarán las secuencias terapéuticas a partir de sus promotores respectivos. Se espera que la retirada de la actividad del promotor de LTR en el vector SIN reduzca significativamente la posibilidad de activación accidental de genes hospedadores (56). La Tabla 4 resume los diversos elementos reguladores presentes en IL13(EQ)BBZ-T2ACD19t_epHIV7.

Tabla 4 Elementos funcionales de IL13(EQ)41BBZ-T2A-CD19t_epHIV7		
Elementos y genes reguladores	Localización (números de nucleótidos)	Comentarios
U5	87-171	Secuencia única 5'
psi	233-345	Señal de encapsidación
RRE	957-1289	Elemento sensible a Rev
flap	1290-1466	Contiene la secuencia de rastreo de polipurina y la secuencia de terminación central para facilitar la importación nuclear del complejo de preintegración
Promotor EF1p	1524-2067	Secuencia del promotor eucariota EF1-alfa que conduce la expresión de CD19Rop
IL13-IgG4(EQ)-41BB-Zeta-T2A-CD19t	2084-4753	Inserto terapéutico
WPRE	4790-5390	Virus de la hepatitis de la marmota derivado del elemento regulador para potenciar el transporte de ARN viral
delU3	5405-5509	3' U3 con delección para generar el vector SIN
R	5510-5590	Secuencia de repetición dentro de LTR
U5	5591-5704	Secuencia 3' U5 en LTR
Amp ^R	6540-7398	Gen de resistencia a ampicilina
CoE1 ori	7461-8342	Origen de replicación de plásmido
SV40 ori	8639-8838	Origen de replicación de SV40
Promotor del CMV	8852-9451	Promotor del CMV para generar ARN del genoma viral
R	9507-86	Secuencia de repetición dentro de LTR

Ejemplo 3: Producción de vectores para la transducción de linfocitos T de paciente

15 Para cada plásmido (IL13(EQ)BBZ-T2A-CD19t_epHIV7; pCgp; pCMV-G; y pCMV-Rev2), se genera un banco de semillas, que se usa para inocular el fermentador para producir cantidades suficientes de ADN de plásmido. Se prueba el ADN de plásmido para identidad, esterilidad y endotoxina antes de su uso en la producción de vector lentiviral.

20 Brevemente, se expandieron las células a partir de las células de trabajo 293T (WCB), que se han probado para confirmar la esterilidad y la ausencia de contaminación viral. Se descongeló un vial de células 293T de WCB 293T. Las células se cultivaron y se expandieron hasta que existieron números suficientes de células para sembrar un número apropiado de 10 fábricas de células en capas (CFs) para la producción de vector y el mantenimiento del tren celular. Se puede usar un único tren de células para la producción.

Se produjo el vector lentiviral en sub-lotes de hasta 10 CFs. Se pueden producir dos sub-lotes en la misma semana que conducen a la producción de aproximadamente 20 L de sobrenadante lentiviral/semana. El material producido a partir de todos los sub-lotes se reunió durante la fase de procesamiento aguas abajo, para producir un lote de producto. Se sembraron células 293T en CFs en medio 293T (DMEM con 10 % de FBS). Las fábricas se pusieron en

una estufa de incubación a 37 °C y se nivelaron horizontalmente para conseguir una distribución uniforme de las células sobre todas las capas de la CF. Dos días después, las células se transfectaron con los cuatro plásmidos lentivirales descritos anteriormente usando el método de CaPO₄, que implica una mezcla de Tris:EDTA, CaCl₂ 2 M, 2X HBS y los cuatro plásmidos de ADN. El día 3 después de la transfección, se recogió el sobrenadante que contenía vectores lentivirales secretados, se purificó y se concentró. Después de retirar el sobrenadante de las CFs, se recogieron las células del final de la producción de cada CF. Se tripsinaron las células de cada fábrica y se recogieron por centrifugación. Las células se resuspendieron en medio de congelación y se criopreservaron. Estas células se usaron después para la prueba de lentivirus competente en la replicación (RCL).

Para purificar y formular vectores, se clarificó por filtración en membrana el sobrenadante en bruto para retirar el residuo celular. Se degradaron el ADN de células hospedadoras y el ADN de plásmido residual por digestión con endonucleasa (Benzonase®). Se depuró el sobrenadante viral del residuo celular usando un filtro de 0,45 µm. Se recogió el sobrenadante depurado en un recipiente previamente pesado en el que se añadió Benzonase® (concentración final 50 U/mL). Se realiza la digestión con endonucleasa para el ADN de plásmido residual y el ADN genómico hospedador a 37 °C durante 6 h. Se usó la concentración de la ultrafiltración de flujo tangencial inicial (TFF) del sobrenadante tratado con endonucleasa para retirar componentes residuales de bajo peso molecular del sobrenadante en bruto, mientras que se concentró el virus ~20 veces. Se hizo circular el sobrenadante viral tratado con endonucleasa depurada a través de un cartucho de fibra hueca con una NMWCO de 500 kD a un caudal diseñado para mantener la velocidad de cizallamiento a ~4.000 s⁻¹ o menos, mientras que se maximice el caudal. Se inició la diafiltración del sobrenadante tratado con nucleasa durante el proceso de concentración para mantener el rendimiento del cartucho. Se estableció una tasa de sustitución de 80 % de permeado usando 4 % de lactosa en PBS como tampón de diafiltración. Se llevó el sobrenadante viral al volumen objetivo, que representa una concentración de 20 veces del sobrenadante en bruto, y la diafiltración continuó durante 4 volúmenes de intercambio adicionales, con la tasa de sustitución de permeado a 100 %.

Se llevó a cabo la concentración adicional del producto viral usando una técnica de centrifugación de alta velocidad. Se sedimentó cada sub-lote del lentivirus usando una centrifugadora Sorvall RC-26 plus a 6000 rpm (6.088 RCF) a 6 °C durante 16-20 h. Entonces se reconstituyó el sedimento viral de cada sub-lote en un volumen de 50 mL con 4 % de lactosa en PBS. El sedimento reconstituido en este tampón representa la formulación final para la preparación de virus. Todo el proceso de concentración de vector produjo una reducción de volumen de 200 veces, aproximadamente. Tras completarse todos los sub-lotes, entonces se dispuso el material a -80 °C, mientras que las muestras de cada sub-lote se probaron para esterilidad. Tras la confirmación de la esterilidad de las muestras, se descongelaron rápidamente los sub-lotes a 37 °C con agitación frecuente. Entonces se reunió el material y se añadieron alícuotas manualmente en la cabina de bioseguridad de clase II tipo A/B3 en el grupo de vector viral. Se usó una configuración de llenado de 1 mL del lentivirus concentrado en crioviales con junta tórica externamente roscados, clase 6 USP estériles. Los sistemas de calidad (QS) del Centro de Desarrollo de Tecnología Aplicada (CATD) en COH aprobaron todos los materiales según las políticas y procedimientos de operación estándar para CBG y en cumplimiento con las buenas prácticas de fabricación actuales (cGMPs).

Para garantizar la pureza de la preparación de vector lentiviral, se probó para contaminantes residuales de ADN hospedador, y la transferencia de ADN hospedador y de plásmido residual. Entre otras pruebas, se evaluó la identidad del vector por RT-PCR para garantizar que estuviera presente el vector correcto. Se cumplieron todos los criterios de aprobación para el vector previsto para su uso en este estudio.

Ejemplo 4: Preparación de linfocitos T adecuados para su uso en ACT

Se obtienen linfocitos T de un paciente por leucoféresis, y se altera genéticamente el subconjunto de linfocitos T alógenos o autólogos apropiado, por ejemplo, linfocitos T de memoria central (T_{CM}), para expresar el CAR, luego se administra de nuevo al paciente por cualquier medio clínicamente aceptable, para la terapia contra el cáncer.

Un resumen de la estrategia de fabricación para T_{CM} se representa en la **Figura 8** (Esquema de fabricación para T_{CM} IL13(EQ)BBZ/CD19t+). Específicamente, se tratan con Ficoll, se lavan y se incuban durante la noche los productos de aféresis obtenidos de los participantes en la investigación que dieron consentimiento. Entonces se agotaron las células en poblaciones de monocitos, linfocitos T reguladores y linfocitos T intactos usando reactivos anti-CD14, anti-CD25 y anti-CD45RA de calidad GMP (Miltenyi Biotec) y el dispositivo de separación CliniMACS™. Tras el agotamiento, se enriquecieron las células de fracción negativa en células T_{CM} CD62L+ usando microperlas de DREG56-biotina (calidad clínica de COH) y anti-biotina (Miltenyi Biotec) en el dispositivo de separación CliniMACS™.

Tras el enriquecimiento, se formulan las células T_{CM} en X-Vivo15 completo más 50 UI/mL de IL-2 y 0,5 ng/mL de IL-15 y se transfirieron a una bolsa de cultivo celular de teflón, donde se estimulan con perlas CD3/CD28 DynalClinEx™ Vivo. Hasta cinco días después de la estimulación, se transducen las células con el vector lentiviral IL13(EQ)BBZ-T2A-CD19t_epHIV7 a una multiplicidad de infección (MOI) de 1,0 a 0,3. Los cultivos se mantienen durante hasta 42 días con adición de X-Vivo15 completo y citocina IL-2 y IL-15 según se requiera para la expansión de células (manteniendo la densidad celular entre 3x10⁵ y 2x10⁶ células viables/mL, y suplementación de citocinas cada lunes, miércoles y viernes de cultivo). Las células se expanden normalmente hasta aproximadamente 10⁹

células en estas condiciones en el plazo de 21 días. Al final del periodo de cultivo se recogen las células, se lavan dos veces y se formulan en medio de criopreservación de calidad clínica (Cryostore CS5, BioLife Solutions).

El (Los) día(s) de infusión de linfocitos T, se descongela, se lava y se formula para re-infusión el producto criopreservado y liberado. Se sacan del almacenamiento en nitrógeno líquido los viales criopreservados que contienen el producto celular liberado, se descongelan, se enfrían y se lavan con un tampón de lavado de PBS/2 % de albúmina de suero humano (HSA). Después de la centrifugación, se retira el sobrenadante y se resuspenden las células en una solución salina normal sin conservante (PFNS)/ 2 % de diluyente de infusión de HSA. Se retiran muestras para la prueba del control de calidad.

Se realizaron dos series de cualificación en células obtenidas de donantes sanos usando la plataforma de fabricación descrita anteriormente. Cada producto de la serie de cualificación preclínica se asignó a un número de donante humano (HD) - HD006.5 y HD187.1. Y, lo que es más importante, como se muestra en la Tabla 5, estas series de cualificación se expandieron >80 veces en el plazo de 28 días y las células expandidas expresaron los transgenes IL13(EQ)BBY/CD19t.

Tabla 5: Resumen de datos de expresión del producto de la serie de cualificación preclínica

Producto celular	CAR	CD19	CD4+	CD8+	Veces de expansión
HD006.5	20 %	22 %	24 %	76 %	84 veces (28 días)
HD187.1	18 %	25 %	37 %	63 %	259 veces (28 días)

Ejemplo 5: Análisis de citometría de flujo de la expresión de marcadores de transgenes superficiales y linfocitos T en T_{CM} IL13(EQ)BBY/CD19t+

Se usaron los dos productos de la serie de cualificación preclínica descritos en el Ejemplo 4 en estudios preclínicos como se describe a continuación. Las Figuras 6A-C representan los resultados del análisis de citometría de flujo de la expresión de marcadores de transgenes superficiales y linfocitos T. Se co-tiñeron T_{CM} IL13(EQ)BBY/CD19t+ HD006.5 y HD187.1 con anti-IL13-PE y anti-CD8-FITC para detectar células CAR+ CD8+ y CAR+ CD4+ (es decir, CD8 negativas) (Figura 6A), o anti-CD 19-PE y anti-CD4-FITC para detectar células CD19t+ CD4+ y CAR+ CD8+ (es decir, CD4 negativas) (Figura 6B). Se tiñeron T_{CM} IL13(EQ)BBY/CD19t+ HD006.5 y HD187.1 con anti-CD3, TCR, CD4, CD8, CD62L y CD28 conjugados con fluorocromo (histogramas grises) o controles de isotipo (histogramas negros). (Figura 6C). En cada una de las Figuras 6A-C, los porcentajes indicados basados en linfocitos viables (DAPI negativos) tiñeron el isotipo anterior.

Ejemplo 6: Actividad efectora de T_{CM} IL13(EQ)BBY/CD19t+

Se evaluó la actividad efectora de T_{CM} IL13(EQ)BBY/CD19t+ y los resultados de este análisis se representan en las Figuras 7A-B. Brevemente, se usaron T_{CM} IL13(EQ)BBY/CD19t+ HD006.5 y HD187.1 como efectores en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr de 6 horas usando una relación 10:1 de E:D basada en la expresión de CD19t. Se manipularon con K562 las dianas de tumor IL13Rα2-positivas para expresar IL13Rα2 (K562-IL13Rα2) y la línea de glioma primario PBT030-2, y el control de dianas de tumor IL13Rα2-negativas fue la línea parental K562 (Figura 7A). Se evaluaron IL13(EQ)BBY/CD19t+ HD006.5 y HD187.1 para la producción de citocinas dependientes de antígeno siguiendo el co-cultivo durante la noche a una relación 10:1 de E:D con las mismas dianas IL13Rα2-positivas y negativas que se describen en anteriormente. Se midieron los niveles de citocinas usando el kit de ensayo de citocinas humanas TH1/TH2 de Bio-Plex Pro y se representan los niveles de INF-γ (Figura 7B).

Ejemplo 7: Actividad antitumoral *in vivo* de T_{CM} IL13(EQ)BBY/CD19t+

Los estudios descritos a continuación demuestran que T_{CM} IL13(EQ)BBY/CD19t+ presentan eficacia antitumoral en modelos de ratón *in vivo*. Específicamente, los presentes inventores han evaluado la potencia antitumoral de T_{CM} IL13(EQ)BBY/CD19t+ contra la línea PBT030-2 de esferas tumorales de glioblastoma de bajo paso primarias IL13Rα2+, que se ha manipulado para expresar tanto genes indicadores EGFP como de luciferasa de luciérnaga (ffLuc) (PBT030-2 EGFP:ffLuc) (6). Un panel de líneas primarias (PBT) de especímenes de glioblastoma de paciente cultivados como esferas tumorales (TSs) en medio libre de suero. Estas líneas de TS expandidas presentan características de tipo célula madre, que incluyen la expresión de marcadores de célula madre, diferenciación multilínea y la capacidad para iniciar tumores ortotópicos en ratones inmunodeprimidos (NSG) a bajos números de células. Se ha usado previamente el modelo de xenoinjerto de iniciado por TS de PBT030-2 EGFP:ffLuc TS (0,1x10⁶ células; injerto de 5 días) para evaluar la actividad antitumoral *in vivo* en ratones NSG de CAR específico de IL13Rα2 que expresan linfocitos T, por lo que se mostró que tres inyecciones de 2x10⁶ linfocitos T citolíticos (CTLs) durante un transcurso de 2 semanas reducían el crecimiento tumoral. Sin embargo, en los experimentos, la mayoría de los tumores de PBT030-2 reaparecieron con el tiempo. Por comparación, una inyección única de T_{CM} IL13(EQ)BBY/CD19t+ (1,1x10⁶ T_{CM} de CAR+; 2x10⁶ T_{CM} totales) presentó una fuerte actividad antitumoral contra tumores de iniciados por TS de PBT030-2 EGFP:ffLuc (0,1x10⁶ células; injerto de 5 días) como se muestra en las

Figuras 8A-C. En comparación con ratones NSG tratados con ya fuera PBS o T_{CM} transducidas con vector vacío (sin CAR), T_{CM} IL13(EQ)BB ζ /CD19t+ reduce significativamente el flujo de ffLuc ($p < 0,001$ en >18 días) y mejora significativamente la supervivencia ($p = 0,0008$).

Brevemente, se implantaron estereotácticamente células tumorales PBT030-2 EGFP-ffLuc+ (1×10^5) en el prosencéfalo derecho de ratones NSG. En el día 5, los ratones recibieron o bien 2×10^6 T_{CM} IL13(EQ)BB ζ /CD19t+ ($1,1 \times 10^6$ CAR+; $n=6$), 2×10^6 T_{CM} simuladas (sin CAR; $n=6$) o bien PBS ($n=6$). La Figura 8A representa ratones representativos de cada grupo que muestra carga tumoral relativa usando Xenogen Living Imagen. La cuantificación del flujo de ffLuc (fotones/s) muestra que T_{CM} IL13(EQ)BB ζ /CD19t+ inducen la regresión tumoral en comparación con T_{CM} transducidas con vector vacío y PBS ($\#p < 0,02$, $*p < 0,001$, ANOVA de medidas repetidas (Figura 8B). Como se muestra en la Figura 8C, una curva de supervivencia de Kaplan Meier ($n=6$ por grupo) demuestra supervivencia significativamente mejorada ($p=0,0008$; prueba del orden logarítmico) para ratones tratados con T_{CM} IL13(EQ)BB ζ /CD19t+.

Ejemplo 8: Comparación de Tcm IL13(EQ)BB ζ + y clones de CTL CD8+ IL13-zetakina distintos de Tcm en eficacia antitumoral y persistencia de linfocitos T

Los estudios descritos a continuación comparan Tcm IL13(EQ)BB ζ + y CTLs CD8+ humanos específicos de IL13R α 2 previamente creados (CTL CD8+ IL13-zetakina (descritos en Brown et al. 2012 Clin Cancer Res 18:2199 y Kahlon et al. 2004 Cancer Res 64:9160). IL13-zetakina usa un dominio coestimulante CD3 ζ , carece de un dominio coestimulante y usa la misma variante de IL13 que IL13(EQ)BB ζ +

Se generó un panel de líneas primarias (PBT) de especímenes de glioblastoma de paciente cultivados como esferas tumorales (TSs) en medio libre de suero (Brown et al. 2012 Clin Cancer Res 18:2199; Brown et al. 2009 Cancer Res 69:8886). Estas líneas de TS expandidas presentan características de tipo célula madre, que incluyen marcadores de expresión de células madre, diferenciación multilínea y capacidad para iniciar tumores ortotópicos en ratones inmunodeprimidos (NSG) a bajos números de células. Se usó la línea de TS PBT030-2 de glioblastoma de bajo paso primario IL13R α 2+, que se ha manipulado para expresar tanto los genes indicadores EGFP como de luciferasa de luciérnaga (ffLuc) (PBT030-2 EGFP:ffLuc) (Brown et al. 2012 Clin Cancer Res 18:2199) para los experimentos expuestos a continuación.

Primero, se comparó una dosis única (1×10^6 linfocitos T de CAR) de producto de Tcm IL13(EQ)BB ζ + con clones de CTL CD8+ IL13-zetakina evaluados contra xenoinjertos iniciados con TS de PBT030-2 EGFP:ffuc de día 8 ($0,1 \times 10^6$ células). Mientras tanto, los linfocitos T de CAR específico de IL13R α 2 (CTL IL13-zetakina y Tcm IL13(EQ)BB ζ) demostraron actividad antitumoral contra tumores de PBT030-2 establecidos en comparación con controles de Tcm no tratadas y simuladas (CAR-negativas) (Figuras 9A y 9B), Tcm IL13(EQ)BB ζ + medió significativamente en la supervivencia mejorada y la remisión duradera de tumores con ratones que vivieron >150 días en comparación con los clones de CTL CD8+ IL13-zetakina de primera generación (Figura 9C).

Para comparar adicionalmente la eficacia terapéutica de estos dos productos de linfocitos T de IL13R α 2-CAR, se realizó una valoración de dosis de 1,0, 0,3 y $0,1 \times 10^6$ linfocitos T de CAR contra tumores iniciados con TS de PBT030-2 EGFP:ffuc de día 8 (Figuras 10A-C). La dosis más alta (1×10^6) de CTL CD8+ IL13-zetakina cl. 2D7 medió en las respuestas antitumorales como se mide por flujo de Xenogen en 3 de 6 animales (Figura 10C), pero no se observaron respuestas antitumorales significativas a dosis más bajas de linfocitos T de CAR. Por comparación, la inyección de producto de Tcm IL13(EQ)BB ζ + medió en la regresión tumoral completa en la mayoría de los ratones a todos los niveles de dosis, que incluye tratamiento con tan solo $0,1 \times 10^6$ linfocitos T de CAR. Estos datos demuestran que Tcm IL13(EQ)BB ζ + es al menos 10 veces más potente que los clones de CTL CD8+ IL13-zetakina en la eficacia antitumoral. La eficacia antitumoral mejorada es debida a la persistencia mejorada de linfocitos T en el microentorno tumoral. La evaluación de linfocitos T CD3+ 7 días después de la inyección i.c. reveló números significativos de Tcm IL13(EQ)BB ζ + en el microentorno tumoral, mientras que estuvieron presentes muy pocos CTLs IL13-zeta de primera generación (Figura 11).

Ejemplo 9: Comparación de la vía de administración de linfocitos T de CAR para el tratamiento de grandes tumores de PBT iniciados por TS

A continuación se describen estudios que comparan la vía de administración, intravenosa (i.v.) o intracraneal (i.c.), en la actividad antitumoral contra líneas de PBT primarias invasivas. En estudios piloto (datos no mostrados), se observó inesperadamente que Tcm IL13(EQ)BB ζ + administrados i.v. no proporcionaron beneficio terapéutico en comparación con PBS para el tratamiento de pequeños tumores de de PBT030-2 EGFP:ffLuc (día 5). Esto es a diferencia de la robusta eficacia terapéutica observada con linfocitos T de CAR+ administrados i.c. Razonando que los tumores de PBT030-2 de día 5 pueden haber sido demasiado pequeños para reclutar linfocitos T terapéuticos de la periferia, se hizo una comparación de la administración i.v. frente a i.c. contra mayores tumores de PBT030-2 EGFP:ffLuc de día 19. Para estos estudios, se trataron los ratones injertados con PBT030-2 con ya fuera dos infusiones i.v. (5×10^6 Tcm de CAR+; días 19 y 26) o cuatro infusiones i.c. (1×10^6 Tcm de CAR+; días 19, 22, 26 y 29) de Tcm IL13(EQ)BB ζ +, o bien Tcm simuladas (sin CAR). Aquí tampoco hay beneficio terapéutico como se monitoriza por obtención de imágenes de Xenogen o análisis de supervivencia de Kaplan-Meier para linfocitos T de CAR+ administrados i.v. (Figuras 12A y 12B). A diferencia, se observó potente actividad antitumoral para Tcm

IL13(EQ)BBζ+ administrados i.c. (**Figuras 12A-B**). A continuación, se recogieron cerebros de una cohorte de ratones 7 días después de la inyección de linfocitos T y se evaluaron para linfocitos T humanos CD3+ por IHC. Sorprendentemente, para ratones tratados i.v. con ya fuera Tcm simuladas como Tcm IL13(EQ)BBζ no hubo linfocitos T humanos CD3+ detectables en el tumor o en otras regiones del cerebro del ratón donde normalmente residen los linfocitos T humanos (es decir, las leptomeninges) (**Figura 12C**), sugiriendo un déficit en el tropismo tumoral. Esto es a diferencia del significativo número de linfocitos T detectados en los ratones tratados i.c. (**Figura 12D**).

Las citocinas derivadas de tumor, particularmente MCP-1/CCL2, son importantes en reclutar linfocitos al tumor. Así, se evaluaron células tumorales PBT030-2 y se encontró que esta línea produce altos niveles de MCP-1/CCL2 comparable a células U251T (datos no mostrados), una línea de glioma que se mostró previamente que atraía linfocitos T CD8+ efectoras i.v. administrados a tumores injertados i.c. Los gliomas malignos son tumores altamente invasivos y son frecuentemente de presentación multifocal. Los estudios descritos anteriormente establecen que T_{CM} IL13BBZ pueden eliminar tumores infiltrados tales como PBT030-2, y mediar en la actividad antitumoral duradera a largo plazo. También se examinó la capacidad de linfocitos T de CAR administrados por vía intracraneal para llegar a enfermedad multifocal. Para este estudio, se implantaron TSs de PBT030-2 EGFP:ffLuc en tanto los hemisferios izquierdo como derecho (**Figura 13A**) y se inyectaron linfocitos T de CAR+ solo en el sitio tumoral derecho. De modo alentador, para todos los ratones evaluados (n=3), los presentes inventores detectaron linfocitos T por IHC de CD3 7 días después de la infusión de linfocitos T tanto en el sitio de inyección (es decir, tumor derecho), como perfectamente dentro del tumor en el hemisferio izquierdo (**Figura 13B**). Estos hallazgos proporcionan evidencia de que los linfocitos T de CAR+ son capaces de llegar e infiltrar los focos tumorales en sitios remotos. También se observaron hallazgos similares en un segundo modelo tumoral usando la línea celular de glioma U251T (datos no mostrados).

Ejemplo 10: Comparación de dominios coestimulantes

Se realizaron una serie de estudios para evaluar los diversos dominios coestimulantes. Se representan esquemáticamente los diversos CAR evaluados en la Figura 14A e incluyeron un CAR de CD3ζ de primera generación que carecía de un dominio coestimulante, incorporando dos CARs de segunda generación tanto un dominio coestimulante 4-1BB como un dominio coestimulante CD28, y conteniendo un CAR de tercera generación tanto un dominio coestimulante CD28 como el dominio coestimulante 41BB. Todas las construcciones de CAR también contienen la secuencia de salto de ribosoma T2A y una secuencia de CD19 truncado (CD19t) como marcador para células transducidas.

Se transdujeron lentiviralmente T_{CM} CD4 y CD8 y se enriquecieron inmunomagnéticamente linfocitos T que expresan CAR enriquecidos mediante anti-CD19. Niveles de expresión de CD19 e IL13 (es decir, CAR) como se mide por citometría de flujo. Los resultados se muestran en la **Figura 14B**. Se determinó la estabilidad de cada construcción de CAR dividiendo la intensidad media de fluorescencia (IMF) de CAR (IL13) entre la del marcador de transducción (CD19t) (**Figura 14C**). Los dos CAR que incluyen un dominio coestimulante 4-1BB presentaron los niveles de expresión más bajos en comparación con el marcador de transducción CD19t.

Se determinó la capacidad de los linfocitos T transducidos con vector vacío y que expresan CAR indicados para destruir dianas de células tumorales PBT030-2 que expresan IL13Rα2 en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr de 4 horas en las relaciones efectoras:diana indicadas. Los resultados de este estudio están en la **Figura 15A** (se representan los % medios de liberación de cromo ± D.E. de pocillos triplicados). Como era de esperar, los linfocitos T transducidos con vector vacío no lisaron eficazmente las dianas. A diferencia, todos los linfocitos T que expresan CAR lisaron las células tumorales de una manera similar. La **Figura 15B** representa los resultados de un estudio en el que los linfocitos T transducidos con vector vacío o que expresan CAR indicados se co-cultivaron durante la noche con células tumorales de PBT030-2 que expresan IL13Rα2 en una relación 10:1 y se analizaron los sobrenadantes para niveles de IL-13 y IFN-γ por matriz citométrica de perlas. De forma interesante, los linfocitos T que expresan los CARs zeta, 41BB-zeta o CD28-41BB-zeta presentaron producción más baja de citocinas estimuladas por antígeno que los linfocitos T que expresan los CAR CD28-zeta.

Se examinó la eficacia *in vivo* de los diversos CAR del siguiente modo. Brevemente, ratones NSG recibieron una inyección intracraneal de células tumorales PBT030-2 ffLuc+ en el día 0, y se aleatorizaron en 6 grupos (n = 9-10 ratones por grupo) para tratamiento i.c. con ya fuera PBS (Tumor solo), linfocitos T transducidos con vector vacío o linfocitos T que expresan el CAR específico de IL13Rα2 indicado en el día 8. Entonces se llevó a cabo la obtención de imágenes de bioluminiscencia cuantitativa para monitorizar el crecimiento tumoral con el tiempo. Imágenes de bioluminiscencia para ratones representativos en cada grupo (**Figura 16A**). Niveles de flujo para cada ratón en el día 27 (**Figura 16B**). Todos los grupos tratados con linfocitos T de CAR específico de IL13Rα2, excepto los tratados con linfocitos T que expresan CD28-CAR, muestran reducción estadísticamente significativa en el volumen del tumor en comparación con ratones tratados con linfocitos T transducidos con vector vacío (**Figura 16C**).

Ejemplo 11: Secuencia de aminoácidos de IL13(EQ)BBζ/CD19t

La secuencia de aminoácidos completa de IL13(EQ)BBζ/CD19t se representa en la **Figura 17**. La secuencia entera (SEQ ID NO: 1) incluye: un péptido señal GMCSF de 22 aminoácidos (SEQ ID NO: 2), una secuencia de IL-13 de

112 aminoácidos (SEQ ID NO: 3; sustitución de aminoácidos E13Y mostrada en negrita); una secuencia de IgG4 de 229 aminoácidos (SEQ ID NO: 4; con sustituciones de aminoácidos L235E y N297Q mostradas en negrita); una secuencia transmembrana CD4 de 22 aminoácidos (SEQ ID NO: 5); una secuencia de 4-1BB de 42 aminoácidos (SEQ ID NO: 6); un conector Gly de 3 aminoácidos; una secuencia de CD3ζ de 112 aminoácidos (SEQ ID NO: 7); una secuencia de T2A de 24 aminoácidos (SEQ ID NO: 8); y una secuencia de CD19t de 323 aminoácidos (SEQ ID NO: 9).

La secuencia madura del receptor de antígeno quimérico (SEQ ID NO: 10) incluye: una secuencia de IL-13 de 112 aminoácidos (SEQ ID NO: 3; sustitución de aminoácidos E13Y mostrada en negrita); una secuencia de IgG4 de 229 aminoácidos (SEQ ID NO: 4; con sustituciones de aminoácidos L235E y N297Q mostradas en negrita); una secuencia CD4 de 22 aminoácidos (SEQ ID NO: 5); una secuencia de 4-1BB de 42 aminoácidos (SEQ ID NO: 6); un conector Gly de 3 aminoácidos; y una secuencia de CD3ζ de 112 aminoácidos (SEQ ID NO: 7). Dentro de esta secuencia de CAR (SEQ ID NO: 10) está la secuencia de IL-13/IgG4/CD4t/4-1BB (SEQ ID NO: 11), que incluye: una secuencia de IL-13 de 112 aminoácidos (SEQ ID NO: 3; sustitución de aminoácidos E13Y mostrada en negrita); una secuencia de IgG4 de 229 aminoácidos (SEQ ID NO: 4; con sustituciones de aminoácidos L235E y N297Q mostradas en negrita); una secuencia de CD4 de 22 aminoácidos (SEQ ID NO: 5); y una secuencia de 4-1BB de 42 aminoácidos (SEQ ID NO: 6). La secuencia de IL13/IgG4/CD4t/4-1BB (SEQ ID NO: 11) se pueden unir a la secuencia de CD3ζ de 112 aminoácidos (SEQ ID NO: 7) por un conector tal como un conector GlyGlyGly. La secuencia de CAR (SEQ ID NO: 10) puede ir precedida por un péptido señal GMCSF de 22 aminoácidos (SEQ ID NO: 2).

La **Figura 18** representa una comparación de las secuencias de IL13(EQ)41BBζ[IL13(EQ)41BBζ T2A-CD19t_epHIV7; pF02630] (SEQ ID NO: 12) y CD19Rop_epHIV7 (pJ01683) (SEQ ID NO: 13).

Ejemplo 12: Secuencia de aminoácidos de IL13(EQ)BBζ/CD19t

Las **Figuras 19-26** representan las secuencias de aminoácidos de CAR adicionales dirigidos contra IL13Rα2, en cada caso están marcados los diversos dominios, excepto para el espaciador GlyGlyGly localizado entre ciertos dominios intracelulares. Cada uno incluye IL13 humana con y Glu a Tyr (SEQ ID NO: 3; sustitución de aminoácidos E13Y mostrada subrayada). En el vector de expresión usado para expresar estos CAR, la secuencia de aminoácidos expresada puede incluir una secuencia de T2A de 24 aminoácidos (SEQ ID NO: 8); y una secuencia de CD19t de 323 aminoácidos (SEQ ID NO: 9) para permitir la expresión coordinada de una secuencia de CD19 truncado sobre la superficie de células que expresan CAR.

Se probó un panel de CAR que comprendía el dominio humano de IL13(E13Y), un dominio de CD28 tm, un dominio coestimulante CD28gg, un dominio coestimulante 4-1BB y un esqueleto de CAR de dominio CD3ζ y que incluye ya sea un espaciador HL (22 aminoácidos), un espaciador de bisagra CD8 (48 aminoácidos), espaciador de IgG4-HL-CH3 (129 aminoácidos) o un espaciador de IgG4(EQ) (229 aminoácidos) para su capacidad para mediar en la destrucción específica de IL13Ra2 como se evalúa en un ensayo de co-cultivo de 72 horas. Con la excepción de HL (22 aminoácidos) que pareció que tenía mala expresión de CAR en este sistema, todos fueron activos.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico, en donde la molécula de ácido nucleico expresa un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de:

GPVPPSTALRYLIEELVNITQNKAPLCNGSMVWSINLTAGMYCAALESLINVSGCSAIEKTQR
MLSGFCPHKVSAGQFSSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLLHLKKLFREGRFNESKYGPPCPPCPAPEF
EGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSRITVDSRWQEGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLGLKMALIVLGGVAGLLLFGLGIFFKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT
IQEEDGCSCRFPPEEEEGGCELGGGRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRG
RDPKMGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDAL
HMQALPPR (SEQ ID NO:10).

- 5 2. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, que comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia señal GMSCFRa que precede a la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor de antígeno quimérico, en donde la secuencia señal GMSCFRa comprende la secuencia de aminoácidos de

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP (SEQ ID NO: 2).

- 10 3. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, que comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de salto de ribosoma T2A y un CD 19 truncado siguiendo la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor de antígeno quimérico.

4. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 3, en donde la secuencia de salto de ribosoma T2A comprende la secuencia de aminoácidos de

LEGGGEGRGSLTTCGDVEENPGPR (SEQ ID NO: 8), y

- 15 en donde CD19 truncado comprende la secuencia de aminoácidos de

MPPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESPLKP
FLKLSLGLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSG
ELFRWNVSDLGGLGCGLNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIWEGEPPCVPPRD
SLNQSLSQDLTMAPGSTLWLSCGVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGPKSLLSLELKDDRRPAR
DMWVMETGLLLPRATAQDAGKYYCHRGNLTMSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWKVS
AVTLAYLIFCLCSLVGILHLQRALVLRKR (SEQ ID NO:9).

5. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1.

6. Una población de linfocitos T humanos que comprende un vector que expresa un receptor de antígeno quimérico que comprende la secuencia de aminoácidos de:

GPVPPSTALRYLIEELVNITQNKAPLCNGSMVWSINLTAGMYCAALESLINVSGCSAIEKTQR
MLSGFCPHKVSAGQFSSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLLHLKKLFREGRFNESKYGPPCPPCPAPEF
EGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSRITVDSRWQEGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLGLKMALIVLGGVAGLLLFGLGIFFKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT
IQEEDGCSCRFPPEEEEGGCELGGGRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRG
RDPKMGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDAL
HMQALPPR (SEQ ID NO: 10).

- 20 7. La población de linfocitos T humanos de la reivindicación 6, en donde los linfocitos T comprenden una población de linfocitos T de memoria central.

8. Una composición para su uso en el tratamiento de cáncer en un paciente, comprendiendo la composición una población de linfocitos T humanos autólogos o alogénos transducidos por un vector que comprende un casete de expresión que codifica un receptor de antígeno quimérico, en donde el receptor de antígeno quimérico comprende la secuencia de aminoácidos de:

5 GPVPPSTALRYLIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGMYCAALESLINVSGCSAIEKTQR
MLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLHLKKLFREGRFNESKYGPPCPPCPAPEF
EGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLGLKMALIVLGGVAGLLLFGLGIFFKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT
IQEEDGCSCRFPPEEEEGGCELGGGRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG
RDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKQHDGLYQGLSTATKDTYDAL
HMQALPPR (SEQ ID NO: 10).

9. La composición para su uso según la reivindicación 8, en donde la población de linfocitos T humanos comprende linfocitos T de memoria central.

10. La composición para su uso según la reivindicación 8, en donde el cáncer es glioblastoma.

10 11. La composición para su uso según la reivindicación 9, en donde los linfocitos T humanos transducidos se prepararon por un método que comprende tratar los linfocitos T obtenidos del paciente para aislar linfocitos T de memoria central, y transducir al menos una porción de los linfocitos de memoria central con un vector viral que comprende un casete de expresión que codifica un receptor de antígeno quimérico, en donde el receptor de antígeno quimérico comprende la secuencia de aminoácidos de:

15 GPVPPSTALRYLIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGMYCAALESLINVSGCSAIEKTQR
MLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLHLKKLFREGRFNESKYGPPCPPCPAPEF
EGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLGLKMALIVLGGVAGLLLFGLGIFFKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT
IQEEDGCSCRFPPEEEEGGCELGGGRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG
RDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKQHDGLYQGLSTATKDTYDAL
HMQALPPR (SEQ ID NO: 10).

FIGURA 1

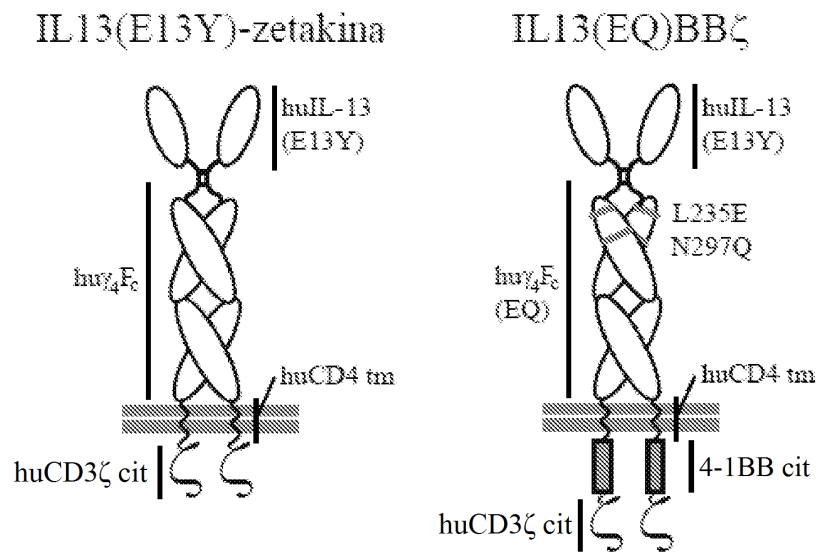


FIGURA 2

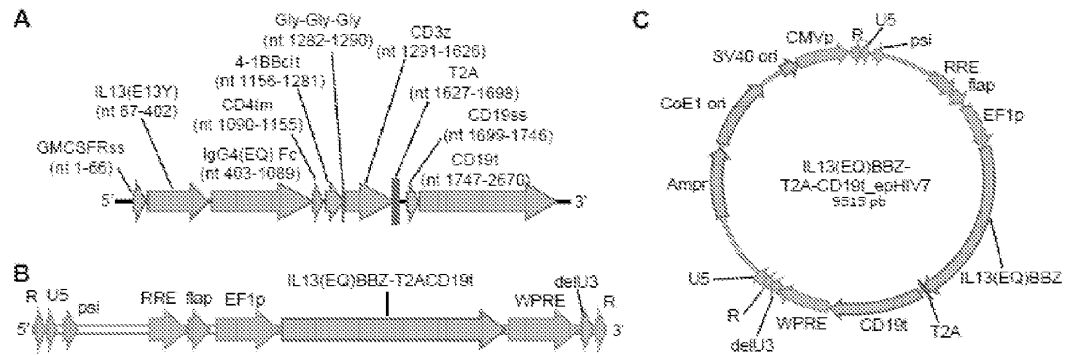


FIGURA 3

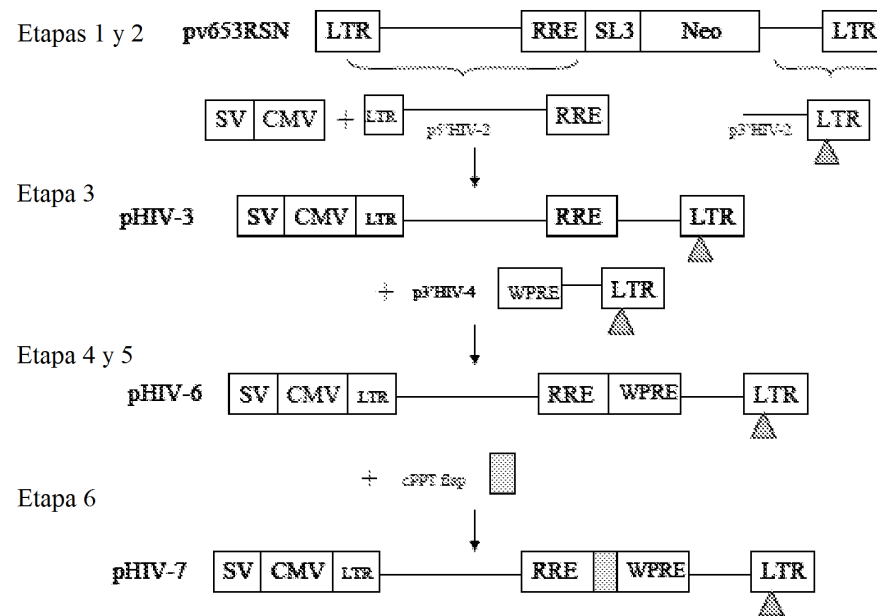


FIGURA 4

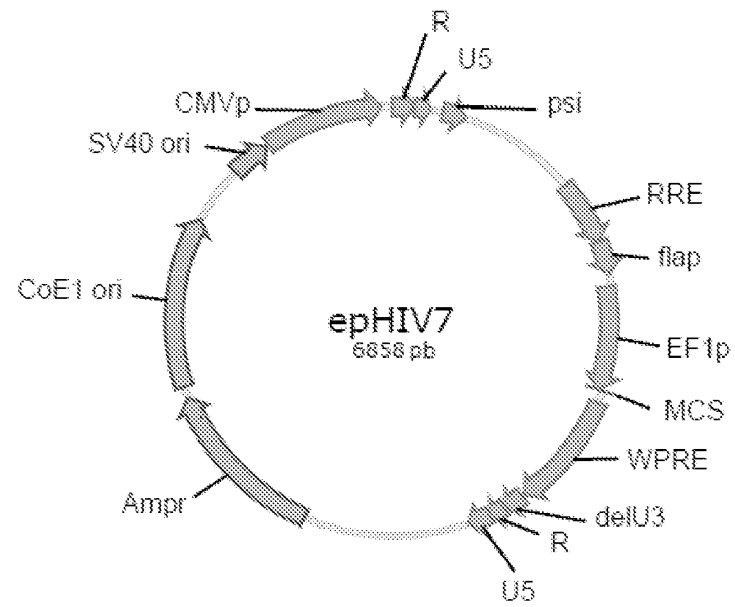


FIGURA 5

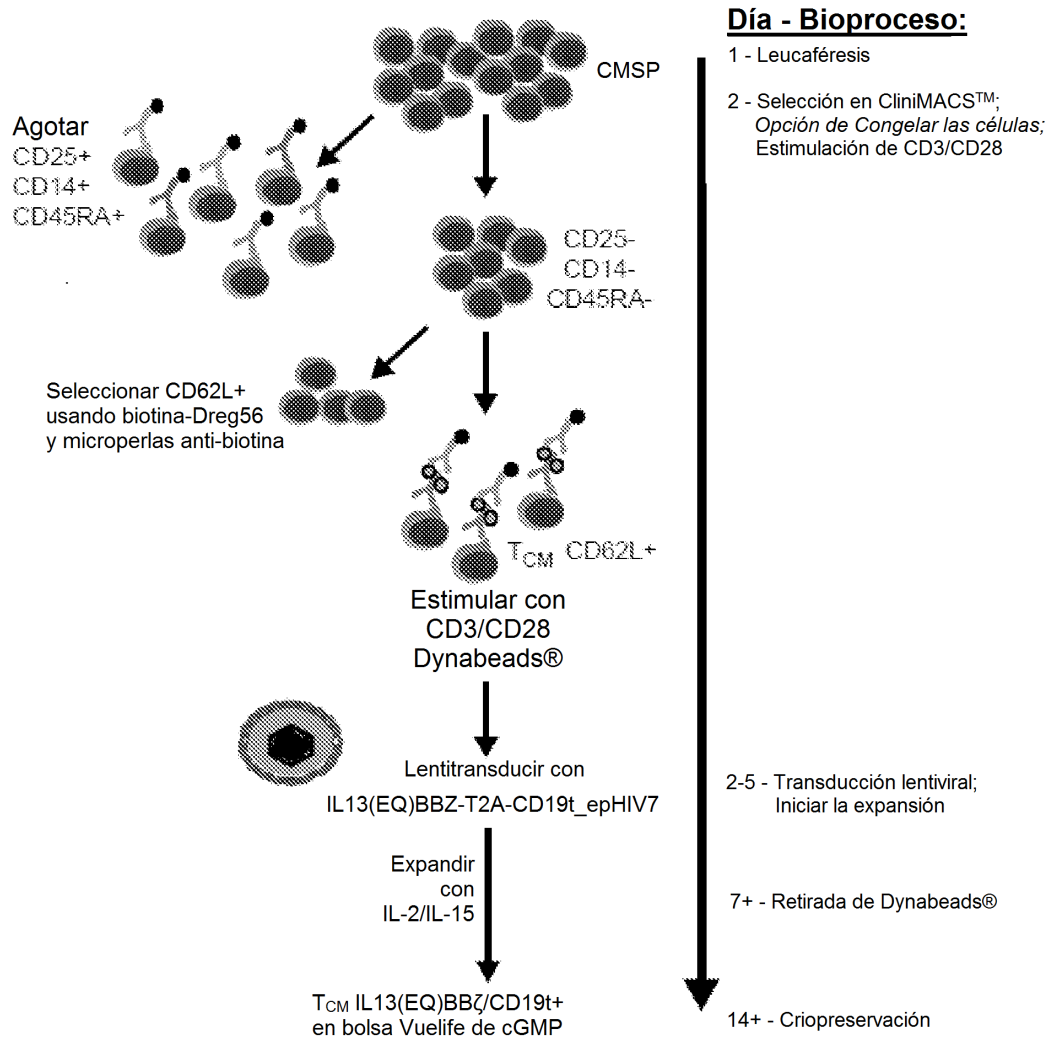


FIGURA 6

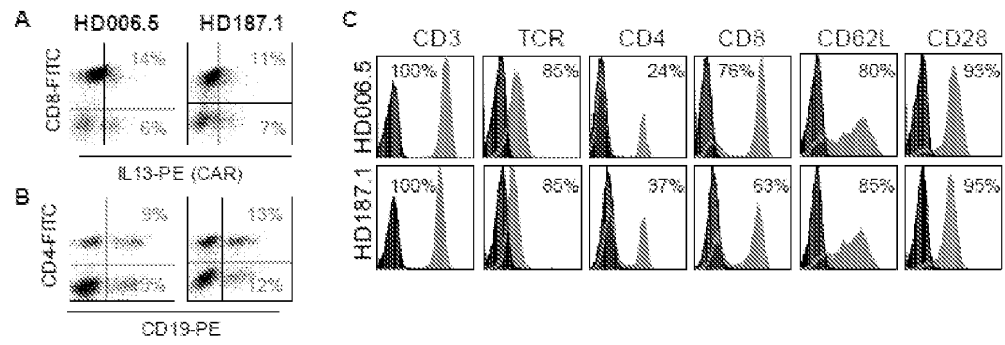


FIGURA 7

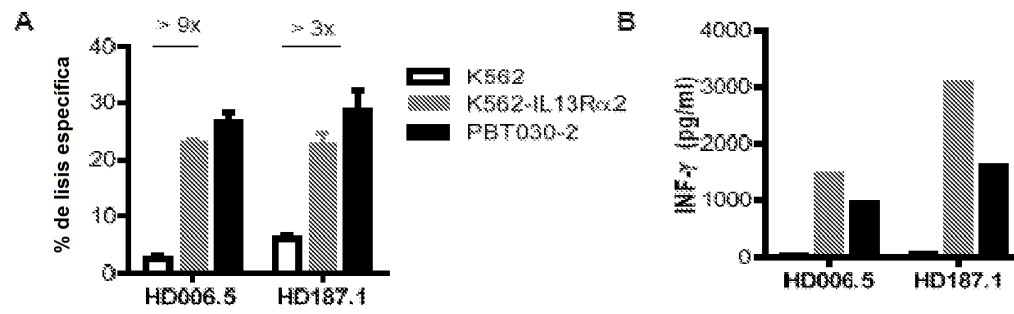
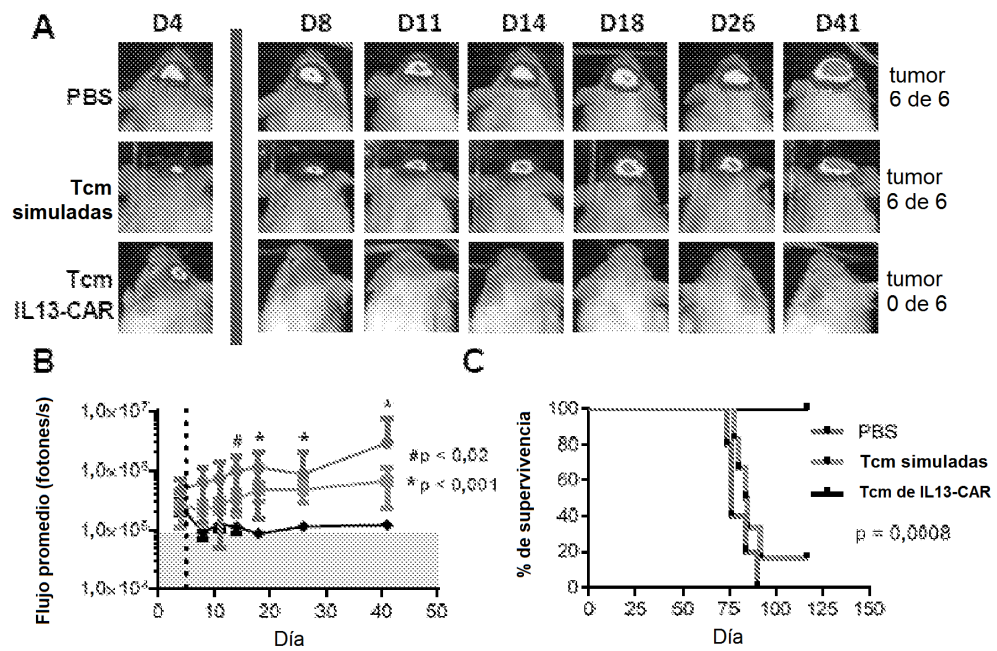
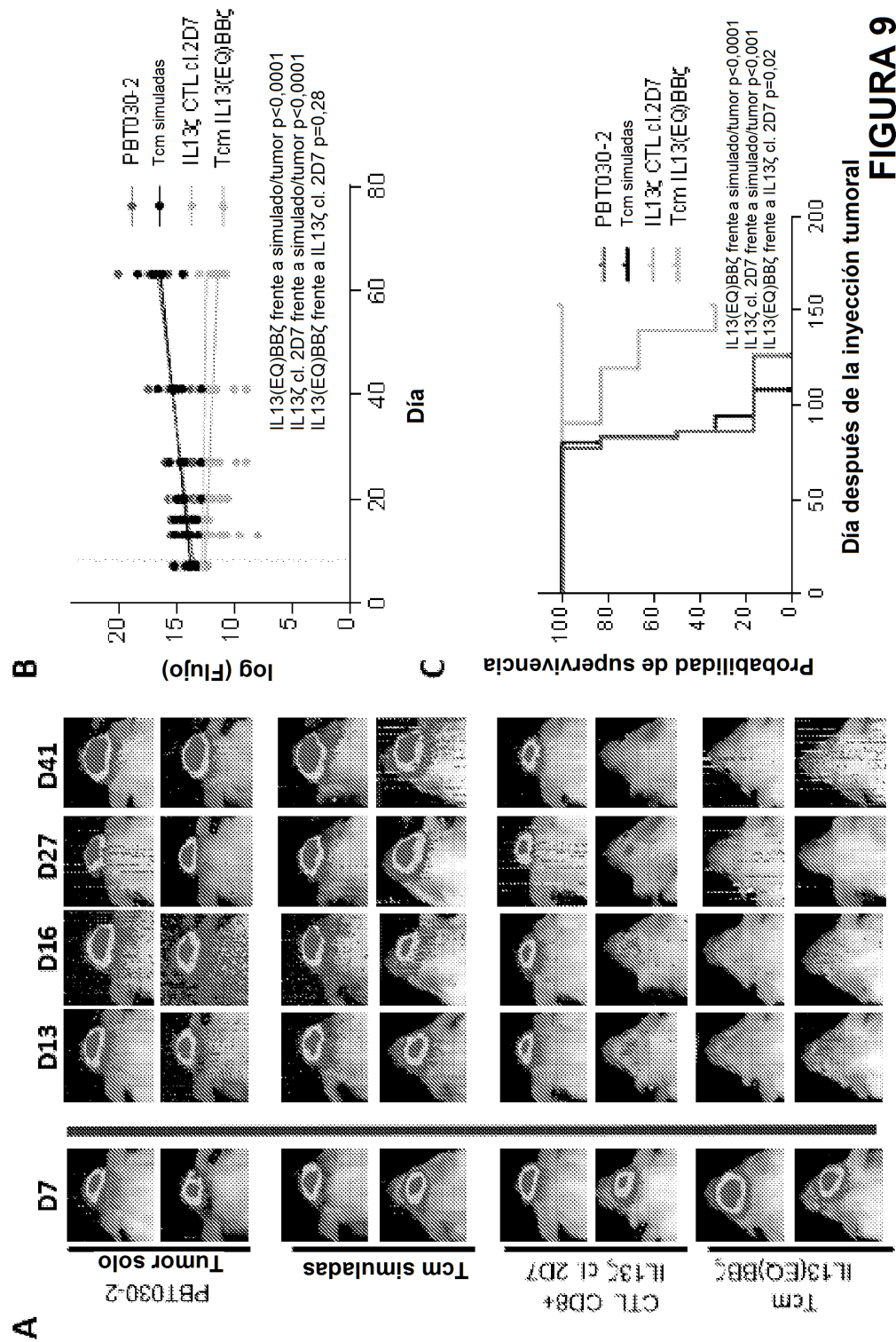


FIGURA 8





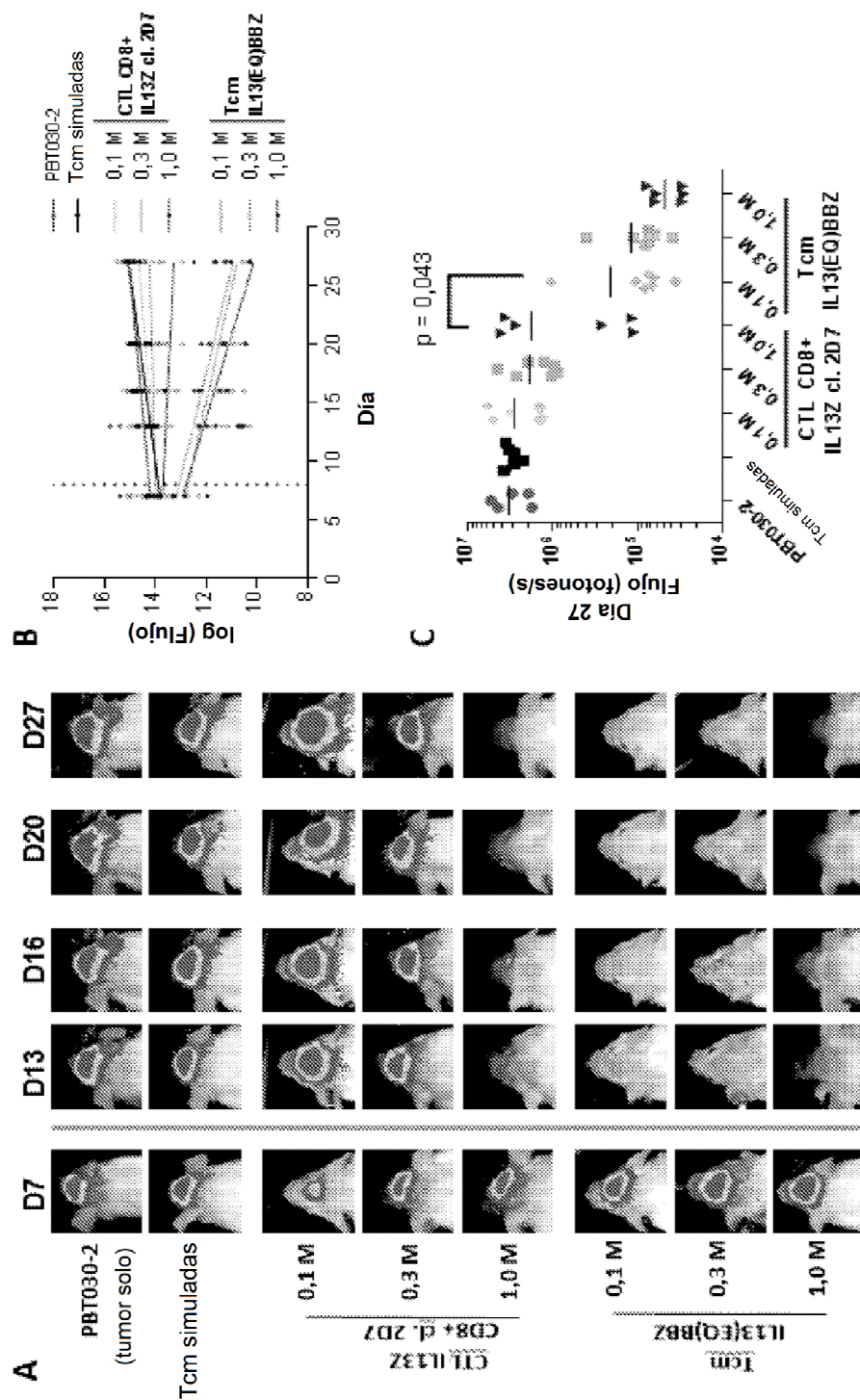


FIGURA 10

FIGURA 11

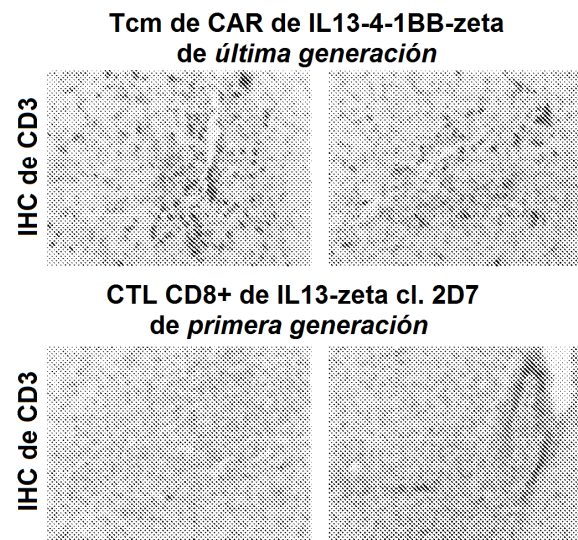
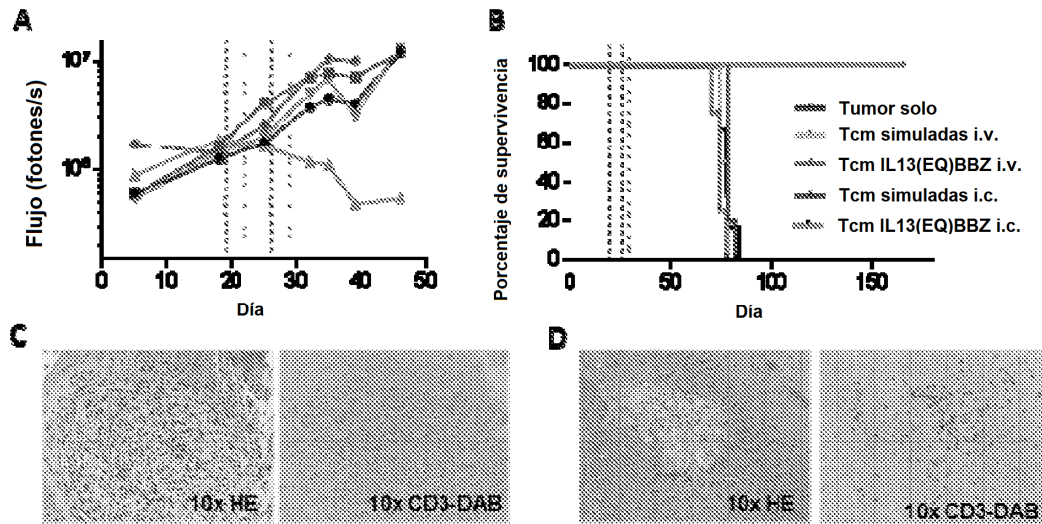


FIGURA 12



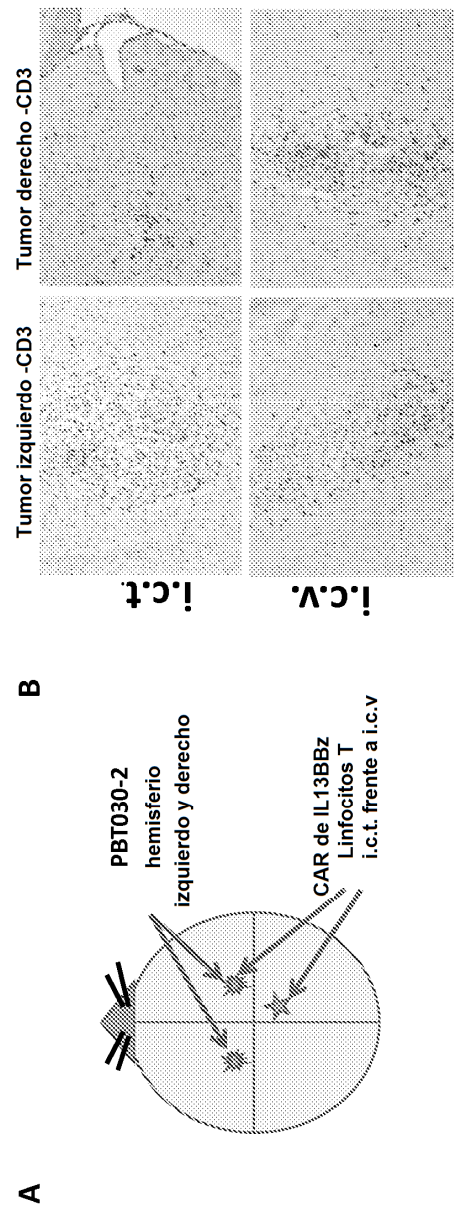


FIGURA 13

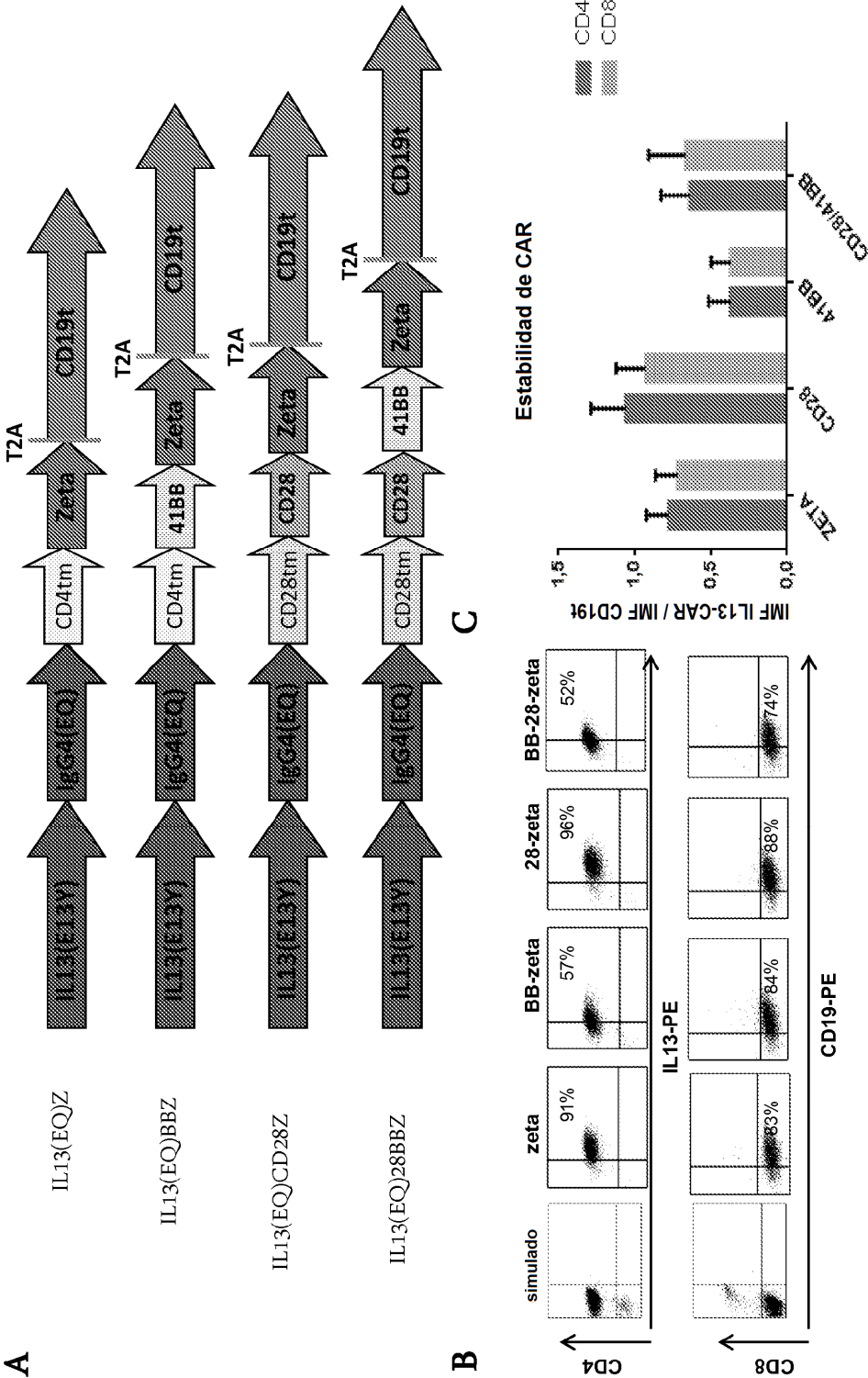
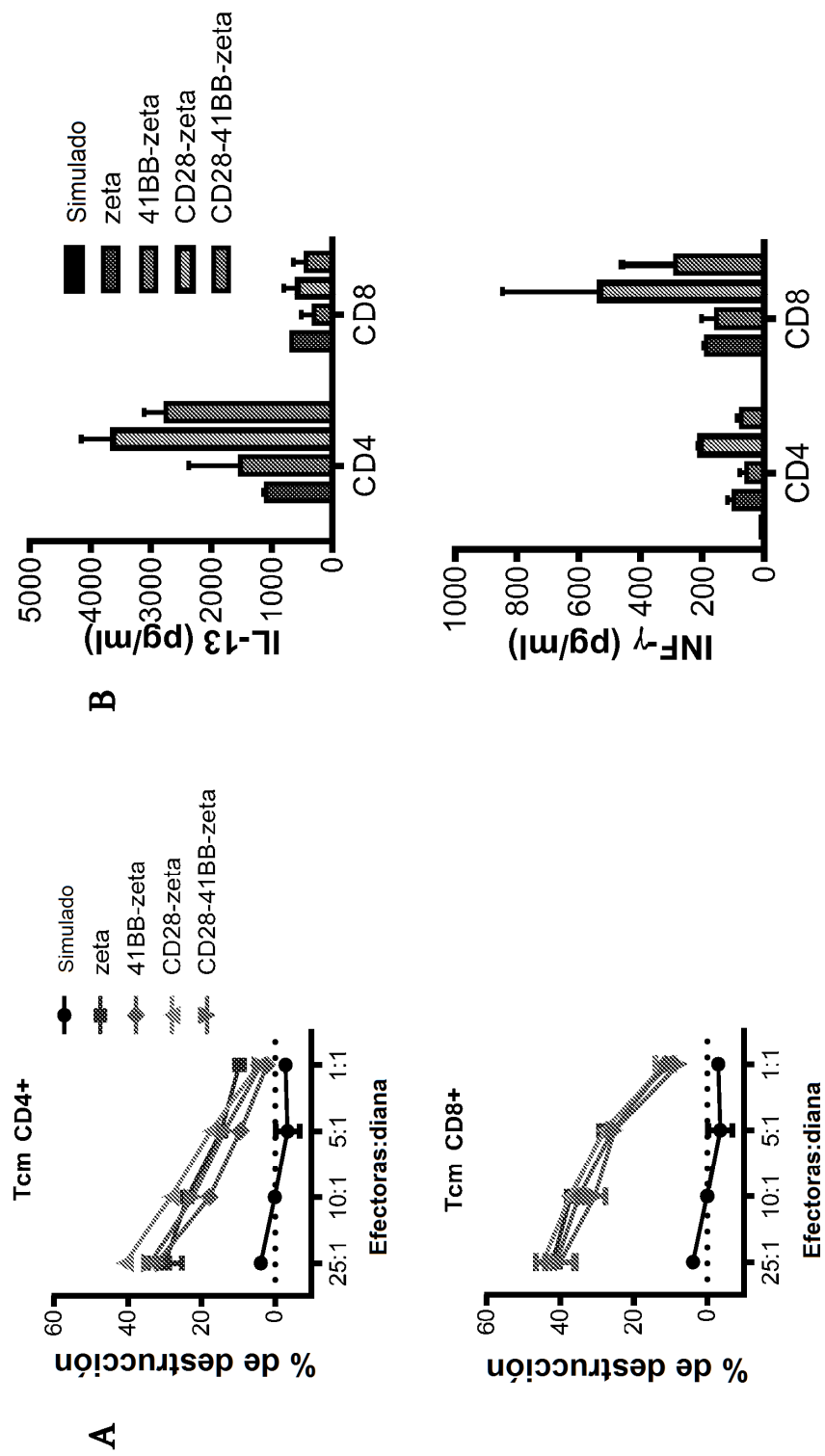


FIGURA 14



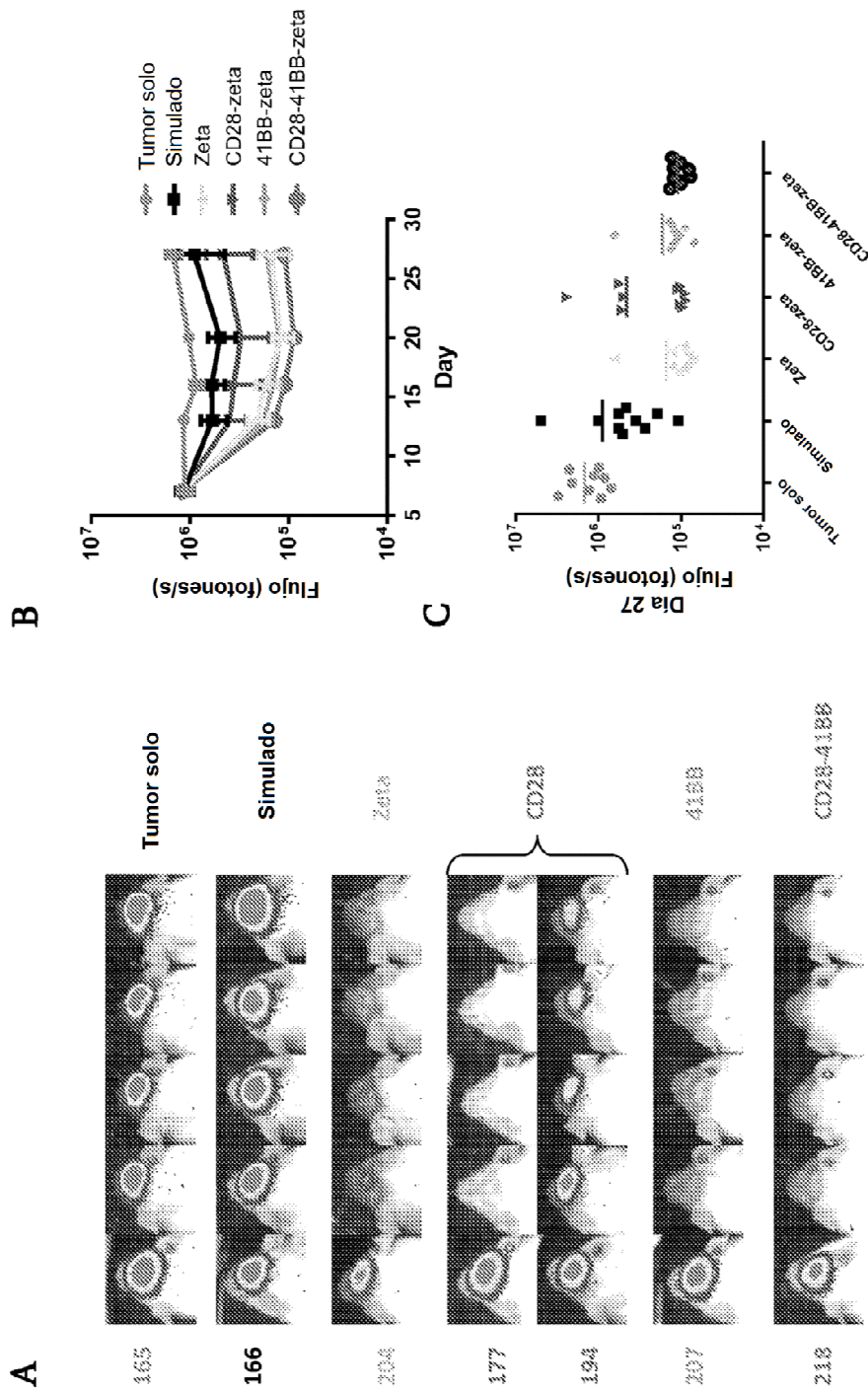


FIGURA 16

FIGURA 17

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPGPVPPSTALRYLIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGM

Péptido señal GMCSFRa (22 aa) IL13 (112 aa)

YCAALESLINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLHLKKLF

REGRFNESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF

IgG4 (L235E, N297Q en negrita) (229 aa)

NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS

KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL

DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLKMALIVLGGVAGLL

CD4tm (22 aa)

LFIGLGIFFKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELGGGRVKFSRSADA

41BB (42 aa)

Gly3 Zeta (112 aa)

PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE

AYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRLLEGGGEGRGSLLTCGDV

T2A (24 aa)

EENPGPRMPPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRE

CD19t (323 aa)

SPLKPFLKLSLGLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVE

GSGELFRWNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIWEGEPPCVPPR

DSLNQSLSQDLTMAPGSTLWLSCGVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGPKSLLSLELKDDRPARD

MWVMETGLLLPRATAQDAGKYYCHRGNLTMFSHLEITARPVLWHWLLRTGGWKVSAVTL

AYLIFCLCSLVGILHLQRALVLRRKR

FIGURA 18

El subrayado amarillo indica la región de codón optimizado de IL-13 que incluye la secuencia señal de GMCSF (IL13op).

subrayado indica la región de codón optimizado de IgG4 (IgG4op[L235E, N297Q]).

subrayado indica los dos cambios de aminoácidos esperados dentro de la región bisagra de IgG4 (L235E y N297Q).

subrayado indica la región de codón optimizado transmembrana CD4.

subrayado indica la región de señalización citoplásmica 41BB (41BB cito).

subrayado indica los conectores de 3 glicinas (g3).

El subrayado gris indica la región de codón optimizado CD3 zeta (zeta op).

subrayado indica la secuencia de T2A (T2A).

subrayado indica la secuencia de CD19 truncado (CD19t).

		1	50
IL13 (EQ) 41BBZeta	(1)	GTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCAC	
CD19Rop_epHIV7	(1)	GTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCAC	
Consenso	(1)	GTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCAC	
		51	100
IL13 (EQ) 41BBZeta	(51)	TGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCC	
CD19Rop_epHIV7	(51)	TGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCC	
Consenso	(51)	TGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCC	
		101	150
IL13 (EQ) 41BBZeta	(101)	CGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAAC TAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTC	
CD19Rop_epHIV7	(101)	CGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAAC TAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTC	
Consenso	(101)	CGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAAC TAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTC	
		151	200
IL13 (EQ) 41BBZeta	(151)	AGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAA	
CD19Rop_epHIV7	(151)	AGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAA	
Consenso	(151)	AGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAA	
		201	250
IL13 (EQ) 41BBZeta	(201)	AGGGAAACCAGAGGAGCTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGC	
CD19Rop_epHIV7	(201)	AGGGAAACCAGAGGAGCTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGC	
Consenso	(201)	AGGGAAACCAGAGGAGCTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGC	
		251	300
IL13 (EQ) 41BBZeta	(251)	GCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTTG	
CD19Rop_epHIV7	(251)	GCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTTG	
Consenso	(251)	GCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTTG	
		301	350
IL13 (EQ) 41BBZeta	(301)	ACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAA	
CD19Rop_epHIV7	(301)	ACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAA	
Consenso	(301)	ACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAA	
		351	400
IL13 (EQ) 41BBZeta	(351)	GCGGGGGAGAATTAGATCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGA	
CD19Rop_epHIV7	(351)	GCGGGGGAGAATTAGATCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGA	
Consenso	(351)	GCGGGGGAGAATTAGATCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGA	
		401	450
IL13 (EQ) 41BBZeta	(401)	AAGAAAAAATATAAATTTAAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGA	
CD19Rop_epHIV7	(401)	AAGAAAAAATATAAATTTAAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGA	
Consenso	(401)	AAGAAAAAATATAAATTTAAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGA	
		451	500

ES 2 738 705 T3

IL13 (EQ) 41BBZeta	(451)	ACGATTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGAC	
CD19Rop_epHIV7	(451)	ACGATTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGAC	
Consenso	(451)	ACGATTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGAC	501 550
IL13 (EQ) 41BBZeta	(501)	AAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAAGCTT	
CD19Rop_epHIV7	(501)	AAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAAGCTT	
Consenso	(501)	AAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAAGCTT	551 600
IL13 (EQ) 41BBZeta	(551)	AGATCATTATATAATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGAT	
CD19Rop_epHIV7	(551)	AGATCATTATATAATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGAT	
Consenso	(551)	AGATCATTATATAATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGAT	601 650
IL13 (EQ) 41BBZeta	(601)	AGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAA	
CD19Rop_epHIV7	(601)	AGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAA	
Consenso	(601)	AGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAA	651 700
IL13 (EQ) 41BBZeta	(651)	ACAAAAGTAAGAAAAAGCACAGCAAGCAGCAGCTGACACAGGACACAGC	
CD19Rop_epHIV7	(651)	ACAAAAGTAAGAAAAAGCACAGCAAGCAGCAGCTGACACAGGACACAGC	
Consenso	(651)	ACAAAAGTAAGAAAAAGCACAGCAAGCAGCAGCTGACACAGGACACAGC	701 750
IL13 (EQ) 41BBZeta	(701)	AATCAGGTCAGCCAAAATTACCCTATAGTGCAGAACATCCAGGGGCAAAAT	
CD19Rop_epHIV7	(701)	AATCAGGTCAGCCAAAATTACCCTATAGTGCAGAACATCCAGGGGCAAAAT	
Consenso	(701)	AATCAGGTCAGCCAAAATTACCCTATAGTGCAGAACATCCAGGGGCAAAAT	751 800
IL13 (EQ) 41BBZeta	(751)	GGTACATCAGGCCATATCACCTAGAAGCTTTAAATGCATGGGTAAAAGTAG	
CD19Rop_epHIV7	(751)	GGTACATCAGGCCATATCACCTAGAAGCTTTAAATGCATGGGTAAAAGTAG	
Consenso	(751)	GGTACATCAGGCCATATCACCTAGAAGCTTTAAATGCATGGGTAAAAGTAG	801 850
IL13 (EQ) 41BBZeta	(801)	TAGAAGAGAAGGCTTTCAGCCCAGAAGTGATACCCATGTTTTTCAGCATT	
CD19Rop_epHIV7	(801)	TAGAAGAGAAGGCTTTCAGCCCAGAAGTGATACCCATGTTTTTCAGCATT	
Consenso	(801)	TAGAAGAGAAGGCTTTCAGCCCAGAAGTGATACCCATGTTTTTCAGCATT	851 900
IL13 (EQ) 41BBZeta	(851)	TCAGAAGGAGCCACCCACAAGATTTAAACACCATGCTAAACACAGTGGG	
CD19Rop_epHIV7	(851)	TCAGAAGGAGCCACCCACAAGATTTAAACACCATGCTAAACACAGTGGG	
Consenso	(851)	TCAGAAGGAGCCACCCACAAGATTTAAACACCATGCTAAACACAGTGGG	901 950
IL13 (EQ) 41BBZeta	(901)	GGGACATCAAGCAGCCATGCAAATGTTAAAAGAGACCATCAATGAGGAAG	
CD19Rop_epHIV7	(901)	GGGACATCAAGCAGCCATGCAAATGTTAAAAGAGACCATCAATGAGGAAG	
Consenso	(901)	GGGACATCAAGCAGCCATGCAAATGTTAAAAGAGACCATCAATGAGGAAG	951 1000
IL13 (EQ) 41BBZeta	(951)	CTGCAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAGAGCAGTGGGAAT	
CD19Rop_epHIV7	(951)	CTGCAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAGAGCAGTGGGAAT	
Consenso	(951)	CTGCAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAGAGCAGTGGGAAT	1001 1050
IL13 (EQ) 41BBZeta	(1001)	AGGAGCTTTGTTTCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCG	
CD19Rop_epHIV7	(1001)	AGGAGCTTTGTTTCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCG	
Consenso	(1001)	AGGAGCTTTGTTTCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCG	1051 1100
IL13 (EQ) 41BBZeta	(1051)	CAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATA	
CD19Rop_epHIV7	(1051)	CAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATA	
Consenso	(1051)	CAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATA	1101 1150
IL13 (EQ) 41BBZeta	(1101)	GTGCAGCAGCAGAACAAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCT	
CD19Rop_epHIV7	(1101)	GTGCAGCAGCAGAACAAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCT	
Consenso	(1101)	GTGCAGCAGCAGAACAAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCT	

ES 2 738 705 T3

		1151	1200
IL13 (EQ) 41BBZeta	(1151)	GTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGG	
CD19Rop_epHIV7	(1151)	GTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGG	
Consenso	(1151)	GTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGG	
		1201	1250
IL13 (EQ) 41BBZeta	(1201)	CTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTGTTGGGGTTGC	
CD19Rop_epHIV7	(1201)	CTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTGTTGGGGTTGC	
Consenso	(1201)	CTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTGTTGGGGTTGC	
		1251	1300
IL13 (EQ) 41BBZeta	(1251)	TCTGGAAAACACTCATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGATCTACAAATGGCA	
CD19Rop_epHIV7	(1251)	TCTGGAAAACACTCATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGATCTACAAATGGCA	
Consenso	(1251)	TCTGGAAAACACTCATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGATCTACAAATGGCA	
		1301	1350
IL13 (EQ) 41BBZeta	(1301)	GTATTCATCCACAATTTTAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGGTACAGTGC	
CD19Rop_epHIV7	(1301)	GTATTCATCCACAATTTTAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGGTACAGTGC	
Consenso	(1301)	GTATTCATCCACAATTTTAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGGTACAGTGC	
		1351	1400
IL13 (EQ) 41BBZeta	(1351)	AGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAAT	
CD19Rop_epHIV7	(1351)	AGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAAT	
Consenso	(1351)	AGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAAT	
		1401	1450
IL13 (EQ) 41BBZeta	(1401)	TACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGAC	
CD19Rop_epHIV7	(1401)	TACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGAC	
Consenso	(1401)	TACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGAC	
		1451	1500
IL13 (EQ) 41BBZeta	(1451)	AGCAGAGATCCAGTTTGGGGATCAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTT	
CD19Rop_epHIV7	(1451)	AGCAGAGATCCAGTTTGGGGATCAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTT	
Consenso	(1451)	AGCAGAGATCCAGTTTGGGGATCAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTT	
		1501	1550
IL13 (EQ) 41BBZeta	(1501)	AGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGAGGATCTGCGATCGCTCCGGTGCCCGTC	
CD19Rop_epHIV7	(1501)	AGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGAGGATCTGCGATCGCTCCGGTGCCCGTC	
Consenso	(1501)	AGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGAGGATCTGCGATCGCTCCGGTGCCCGTC	
		1551	1600
IL13 (EQ) 41BBZeta	(1551)	AGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGG	
CD19Rop_epHIV7	(1551)	AGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGG	
Consenso	(1551)	AGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGG	
		1601	1650
IL13 (EQ) 41BBZeta	(1601)	GTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGA	
CD19Rop_epHIV7	(1601)	GTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGA	
Consenso	(1601)	GTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGA	
		1651	1700
IL13 (EQ) 41BBZeta	(1651)	AAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAAC	
CD19Rop_epHIV7	(1651)	AAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAAC	
Consenso	(1651)	AAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAAC	
		1701	1750
IL13 (EQ) 41BBZeta	(1701)	CGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTT	
CD19Rop_epHIV7	(1701)	CGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTT	
Consenso	(1701)	CGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTT	
		1751	1800
IL13 (EQ) 41BBZeta	(1751)	GCCGCCAGAACACAGCTGAAGCTTCGAGGGGCTCGCATCTCTCCTTCACG	
CD19Rop_epHIV7	(1751)	GCCGCCAGAACACAGCTGAAGCTTCGAGGGGCTCGCATCTCTCCTTCACG	
Consenso	(1751)	GCCGCCAGAACACAGCTGAAGCTTCGAGGGGCTCGCATCTCTCCTTCACG	
		1801	1850
IL13 (EQ) 41BBZeta	(1801)	CGCCCGCCGCCCTACCTGAGGCCGCCATCCACGCCGTTGAGTCGCGTTC	
CD19Rop_epHIV7	(1801)	CGCCCGCCGCCCTACCTGAGGCCGCCATCCACGCCGTTGAGTCGCGTTC	

ES 2 738 705 T3

Consenso	(1801)	CGCCCGCCGCCCTACCTGAGGCCGCCATCCACGCCGGTTGAGTCGCGGTT	1851	1900
IL13 (EQ) 41BBZeta	(1851)	TGCCGCCTCCCGCCTGTGGTGCCTCCTGAACTGCGTCCGCCGTCTAGGTA		
CD19Rop_epHIV7	(1851)	TGCCGCCTCCCGCCTGTGGTGCCTCCTGAACTGCGTCCGCCGTCTAGGTA		
Consenso	(1851)	TGCCGCCTCCCGCCTGTGGTGCCTCCTGAACTGCGTCCGCCGTCTAGGTA	1901	1950
IL13 (EQ) 41BBZeta	(1901)	AGTTTAAAGCTCAGGTCGAGACCGGGCCTTTGTCCGGCGCTCCCTTGAG		
CD19Rop_epHIV7	(1901)	AGTTTAAAGCTCAGGTCGAGACCGGGCCTTTGTCCGGCGCTCCCTTGAG		
Consenso	(1901)	AGTTTAAAGCTCAGGTCGAGACCGGGCCTTTGTCCGGCGCTCCCTTGAG	1951	2000
IL13 (EQ) 41BBZeta	(1951)	CCTACCTAGACTCAGCCGGCTCTCCACGCTTTGCCTGACCTGCTTGCTC		
CD19Rop_epHIV7	(1951)	CCTACCTAGACTCAGCCGGCTCTCCACGCTTTGCCTGACCTGCTTGCTC		
Consenso	(1951)	CCTACCTAGACTCAGCCGGCTCTCCACGCTTTGCCTGACCTGCTTGCTC	2001	2050
IL13 (EQ) 41BBZeta	(2001)	AACTCTACGTCTTTGTTTCGTTTTCTGTTCTGCGCCGTTACAGATCCAAG		
CD19Rop_epHIV7	(2001)	AACTCTACGTCTTTGTTTCGTTTTCTGTTCTGCGCCGTTACAGATCCAAG		
Consenso	(2001)	AACTCTACGTCTTTGTTTCGTTTTCTGTTCTGCGCCGTTACAGATCCAAG	2051	2100
IL13 (EQ) 41BBZeta	(2051)	CTGTGACCGGCGCCTACGGCTAGCGCCGCCACCATGCTGCTGCTGGTGAC		
CD19Rop_epHIV7	(2051)	CTGTGACCGGCGCCTACGGCTAGCGCCGCCACCATGCTGCTGCTGGTGAC		
Consenso	(2051)	CTGTGACCGGCGCCTACGGCTAGCGCCGCCACCATGCTGCTGCTGGTGAC	2101	2150
IL13 (EQ) 41BBZeta	(2101)	CAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCCCACCCCGCCTTTCTGCTGATCCCTG		
CD19Rop_epHIV7	(2101)	CAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCCCACCCCGCCTTTCTGCTGATCCCG		
Consenso	(2101)	CAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCCCACCCCGCCTTTCTGCTGATCCC G	2151	2200
IL13 (EQ) 41BBZeta	(2151)	GC---CCCG-TGCCCCCTAGCACCGCC---CTGCGCTACCTGATCGAGGAA		
CD19Rop_epHIV7	(2151)	ACATCCAGATGACCCAGACCACCTCCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGAC		
Consenso	(2151)	C CC G TG CCC A CACC CC CTG GC C T G GA	2201	2250
IL13 (EQ) 41BBZeta	(2195)	CTGGTGA-----ACATCACCAGAACAGAA		
CD19Rop_epHIV7	(2201)	CGGGTGACCATCAGCTGCCGGGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAA		
Consenso	(2201)	C GGTGA ACATCA C AG ACC GAA	2251	2300
IL13 (EQ) 41BBZeta	(2221)	-----AGCCC-----CC-----CTGTGCAAC----		
CD19Rop_epHIV7	(2251)	CTGGTATCAGCAGAAAGCCCGACGGCACCGTCAAGCTGCTGATCTACCACA		
Consenso	(2251)	AGCCC CC CTG C AC	2301	2350
IL13 (EQ) 41BBZeta	(2237)	-----GGCAGCAT---GGTGTG-----		
CD19Rop_epHIV7	(2301)	CCAGCCGCTGCACAGCGCGTGCCAGCCGGTTAGCGGCAGCGGCTCC		
Consenso	(2301)	GGC GCA GG GTG	2351	2400
IL13 (EQ) 41BBZeta	(2251)	-----GAGCATC---AACCTG-----		
CD19Rop_epHIV7	(2351)	GGCACCAGACTACAGCCTGACCATCTCCAACCTGGAACAGGAAGATATCGC		
Consenso	(2351)	GA CATC AACCTG	2401	2450
IL13 (EQ) 41BBZeta	(2264)	-ACC-----GCCGGCATGT-----ACTG-----TGCCGCC-		
CD19Rop_epHIV7	(2401)	CACCTACTTTTGCCAGCAGGGCAACACACTGCCCTACACCTTTGGCGGCG		
Consenso	(2401)	ACC GCC GCA G ACTG TG CG C	2451	2500
IL13 (EQ) 41BBZeta	(2288)	-----CTGGAAA-----GCCTGATCAACGTGAGCGGCT-----		
CD19Rop_epHIV7	(2451)	GAACAAAGCTGGAAATCACCGGCAGCACCTCCGGCAGCGCAAGCCTGGC		
Consenso	(2451)	CTGGAAA GC A C CG AGCGGC	2501	2550
IL13 (EQ) 41BBZeta	(2316)	-----GCAGCGCCATCG-----AGAAAA-----		

ES 2 738 705 T3

CD19Rop_epHIV7	(2501)	AGCGGCGAGGGCAGCACCAAGGGCGAGGTGAAGCTGCAGGAAAGCGGCC	
Consenso	(2501)	GCAGC CCA G	AG AAA
		2551	2600
IL13 (EQ) 41BBZeta	(2334)	-----CCCAGCG-----	
CD19Rop_epHIV7	(2551)	TGGCCTGGTGGCCCCAGCCAGAGCCTGAGCGTGACCTGCACCGTGAGCG	
Consenso	(2551)	CCCAGC	
		2601	2650
IL13 (EQ) 41BBZeta	(2341)	----GATGCTGTCCGGCTTCTGC-----CCCCACAAG	
CD19Rop_epHIV7	(2601)	GCGTGAGCCTGCCCCGACTACGGCGTGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGG	
Consenso	(2601)	GA CTG CCG CT C GC	CCCC CA G
		2651	2700
IL13 (EQ) 41BBZeta	(2369)	-----GTGTCCGCCGGAC-----AGTT	
CD19Rop_epHIV7	(2651)	AAGGGCCTGGAATGGCTGGGCGTGATCTGGGGCAGCGAGACCACCTACTA	
Consenso	(2651)		G G C GC GAC A T
		2701	2750
IL13 (EQ) 41BBZeta	(2386)	CAGCAGCCTGC--ACGTGCGGG-----ACACCAAGA	
CD19Rop_epHIV7	(2701)	CAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACAGCAAGA	
Consenso	(2701)	CA CAGC C A G GC GG	ACA CAAGA
		2751	2800
IL13 (EQ) 41BBZeta	(2415)	TCGAGGTGGCCAGTTCGTGAAGGACCTGCTG-----C	
CD19Rop_epHIV7	(2751)	GCCAGGTGTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATC	
Consenso	(2751)	C AGGTG CC G TGAA CCTGC G	C
		2801	2850
IL13 (EQ) 41BBZeta	(2448)	TGCACCTG----AAGAA-----GCTGTTCCG----GGA---	
CD19Rop_epHIV7	(2801)	TACTACTGCGCCAAGCACTACTACTACGGCGGCAGCTACGCCATGGACTA	
Consenso	(2801)	T C CTG AAG A	GC G T CG GGA
		2851	2900
IL13 (EQ) 41BBZeta	(2473)	---GGGCCGGTTCAAC-----	
CD19Rop_epHIV7	(2851)	CTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACCGTGAGCAGCGAGAGCAAGTACGGCC	
Consenso	(2851)	GGGCC G CA C	GAGAGCAAGTACGGCC
		2901	2950
IL13 (EQ) 41BBZeta	(2502)		
CD19Rop_epHIV7	(2901)	CTCCCTGCCCCCTTGCCCTGCCCCGAGTTCCTGGGCGGACCCAGCGTG	
Consenso	(2901)	CTCCCTGCCCCCTTGCCCTGCCCC GAGTTC	GGGCGGACCCAGCGTG
		2951	3000
IL13 (EQ) 41BBZeta	(2552)		
CD19Rop_epHIV7	(2951)	TTCCTGTTCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCC	
Consenso	(2951)	TTCCTGTTCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCC	
		3001	3050
IL13 (EQ) 41BBZeta	(2602)		
CD19Rop_epHIV7	(3001)	CGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGATCCCGAGGTCC	
Consenso	(3001)	GAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGATCC GAGGTCC	
		3051	3100
IL13 (EQ) 41BBZeta	(2652)		
CD19Rop_epHIV7	(3051)	AGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAG	
Consenso	(3051)	AGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAG	
		3101	3150
IL13 (EQ) 41BBZeta	(2702)		
CD19Rop_epHIV7	(3101)	CCCAGGGAAGAGCAGTTCAACAGCACCTACCGGTTGGTGTCCGTGCTGAC	
Consenso	(3101)	CCCAGGGAAGAGCAGTTC A AGCACCTACCGGTTGGTGTCCGTGCTGAC	
		3151	3200
IL13 (EQ) 41BBZeta	(2752)		
CD19Rop_epHIV7	(3151)	CGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATAACAAGTGCAAGGTGT	
Consenso	(3151)	CGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATAACAAGTGCAAGGTGT	
		3201	3250

ES 2 738 705 T3

IL13 (EQ) 41BBZeta	(2802)		
CD19Rop_epHIV7	(3201)	CCAACAAGGGCCTGCCAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAG	
Consenso	(3201)	CCAACAAGGGCCTGCCAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAG	3300
		3251	
IL13 (EQ) 41BBZeta	(2852)		
CD19Rop_epHIV7	(3251)	GGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTTCCCAGGAAGA	
Consenso	(3251)	GGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTTCCCAGGAAGA	3350
		3301	
IL13 (EQ) 41BBZeta	(2902)		
CD19Rop_epHIV7	(3301)	GATGACCAAGAATCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACC	
Consenso	(3301)	GATGACCAAGAATCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACC	3400
		3351	
IL13 (EQ) 41BBZeta	(2952)		
CD19Rop_epHIV7	(3351)	CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGCCAGCCCGAGAACAAC	
Consenso	(3351)	CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGCCAGCCCGAGAACAAC	3450
		3401	
IL13 (EQ) 41BBZeta	(3002)	TACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTA	
CD19Rop_epHIV7	(3401)	TACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTA	
Consenso	(3401)	TACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTA	3500
		3451	
IL13 (EQ) 41BBZeta	(3052)	CAGCAGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTCTTTA	
CD19Rop_epHIV7	(3451)	CAGCAGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTCTTTA	
Consenso	(3451)	CAGCAGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTCTTTA	3550
		3501	
IL13 (EQ) 41BBZeta	(3102)	GCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGC	
CD19Rop_epHIV7	(3501)	GCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGC	
Consenso	(3501)	GCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGC	3600
		3551	
IL13 (EQ) 41BBZeta	(3152)	CTGTCCCTGAGCCTGGGCAAG	
CD19Rop_epHIV7	(3551)	CTGTCCCTGAGCCTGGGCAAGATGGCCCTGATCGTGCTGGGCGGCGTGGC	
Consenso	(3551)	CTGTCCCTGAGCCTGGGCAAGATGGCCCTGATCGTGCTGGGCGGCGTGGC	3650
		3601	
IL13 (EQ) 41BBZeta	(3202)		
CD19Rop_epHIV7	(3601)	CGGGCTGCTGCTGTTCATCGGCCTGGGCATCTTTTTC-----	
Consenso	(3601)	CGGGCTGCTGCTGTTCATCGGCCTGGGCATCTTTTTC	3700
		3651	
IL13 (EQ) 41BBZeta	(3252)		
CD19Rop_epHIV7	(3638)	-----C-----	
Consenso	(3651)	C	3750
		3701	
IL13 (EQ) 41BBZeta	(3302)		
CD19Rop_epHIV7	(3639)	-----	
Consenso	(3701)		3800
		3751	
IL13 (EQ) 41BBZeta	(3352)	CGGGTGAAGTTCAGCCGGTCCGCCGACG	
CD19Rop_epHIV7	(3639)	-----GGGTGAAGTTCAGCCGGTCCGCCGACG	
Consenso	(3751)	GGGTGAAGTTCAGCCGGTCCGCCGACG	3850
		3801	
IL13 (EQ) 41BBZeta	(3402)	CCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTG	
CD19Rop_epHIV7	(3666)	CCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTG	
Consenso	(3801)	CCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTG	3900
		3851	
IL13 (EQ) 41BBZeta	(3452)	GGCAGGCGGGAGGAATACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGCCGGGACCC	
CD19Rop_epHIV7	(3716)	GGCAGGCGGGAGGAATACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGCCGGGACCC	
Consenso	(3851)	GGCAGGCGGGAGGAATACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGCCGGGACCC	

ES 2 738 705 T3

		3901	3950
IL13 (EQ) 41BBZeta	(3502)	TGAGATGGGCGGCAAGCCTCGGCGGAAGAACCCCCAGGAAGGCCTGTATA	
CD19Rop_epHIV7	(3766)	TGAGATGGGCGGCAAGCCCGAGGCGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTATA	
Consenso	(3901)	TGAGATGGGCGGCAAGCC GGCGGAAGAACCC CAGGAAGGCCTGTATA	
		3951	4000
IL13 (EQ) 41BBZeta	(3552)	ACGAACTGCAGAAAAGACAAGATGGCCGAGGCCCTACAGCGAGATCGGCATG	
CD19Rop_epHIV7	(3816)	ACGAACTGCAGAAAAGACAAGATGGCCGAGGCCCTACAGCGAGATCGGCATG	
Consenso	(3951)	ACGAACTGCAGAAAAGACAAGATGGCCGAGGCCCTACAGCGAGATCGGCATG	
		4001	4050
IL13 (EQ) 41BBZeta	(3602)	AAGGGCGAGCGGAGGCGGGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTATCAGGGCCT	
CD19Rop_epHIV7	(3866)	AAGGGCGAGCGGAGGCGGGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTATCAGGGCCT	
Consenso	(4001)	AAGGGCGAGCGG GG GGGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTAT CAGGGCCT	
		4051	4100
IL13 (EQ) 41BBZeta	(3652)	GTCCACCGCCACCAAGGATACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGC	
CD19Rop_epHIV7	(3916)	GAGCACCGCCACCAAGGATACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGC	
Consenso	(4051)	G CACCGCCACCAAGGATACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGC	
		4101	4150
IL13 (EQ) 41BBZeta	(3702)	CCCCAAGG	
CD19Rop_epHIV7	(3966)	CCCC-----	
Consenso	(4101)	CCCC	
		4151	4200
IL13 (EQ) 41BBZeta	(3752)		
CD19Rop_epHIV7	(3970)	-----	
Consenso	(4151)		
		4201	4250
IL13 (EQ) 41BBZeta	(3802)		
CD19Rop_epHIV7	(3970)	-----	
Consenso	(4201)		
		4251	4300
IL13 (EQ) 41BBZeta	(3852)		
CD19Rop_epHIV7	(3970)	-----	
Consenso	(4251)		
		4301	4350
IL13 (EQ) 41BBZeta	(3902)		
CD19Rop_epHIV7	(3970)	-----	
Consenso	(4301)		
		4351	4400
IL13 (EQ) 41BBZeta	(3952)		
CD19Rop_epHIV7	(3970)	-----	
Consenso	(4351)		
		4401	4450
IL13 (EQ) 41BBZeta	(4002)		
CD19Rop_epHIV7	(3970)	-----	
Consenso	(4401)		
		4451	4500
IL13 (EQ) 41BBZeta	(4052)		
CD19Rop_epHIV7	(3970)	-----	
Consenso	(4451)		
		4501	4550
IL13 (EQ) 41BBZeta	(4102)		
CD19Rop_epHIV7	(3970)	-----	
Consenso	(4501)		
		4551	4600
IL13 (EQ) 41BBZeta	(4152)		
CD19Rop_epHIV7	(3970)	-----	

ES 2 738 705 T3

Consenso	(4551)		
		4601	4650
IL13 (EQ) 41BBZeta	(4202)		
CD19Rop_epHIV7	(3970)	-----	
Consenso	(4601)		
		4651	4700
IL13 (EQ) 41BBZeta	(4252)		
CD19Rop_epHIV7	(3970)	-----	
Consenso	(4651)		
		4701	4750
IL13 (EQ) 41BBZeta	(4302)		
CD19Rop_epHIV7	(3970)	-----C-----AGG-----	
Consenso	(4701)		
		4751	4800
IL13 (EQ) 41BBZeta	(4352)		
CD19Rop_epHIV7	(3974)	-----T-----	
Consenso	(4751)		
		4801	4850
IL13 (EQ) 41BBZeta	(4402)		
CD19Rop_epHIV7	(3975)	-----	
Consenso	(4801)		
		4851	4900
IL13 (EQ) 41BBZeta	(4452)		
CD19Rop_epHIV7	(3975)	-----	
Consenso	(4851)		
		4901	4950
IL13 (EQ) 41BBZeta	(4502)		
CD19Rop_epHIV7	(3975)	-----	
Consenso	(4901)		
		4951	5000
IL13 (EQ) 41BBZeta	(4552)		
CD19Rop_epHIV7	(3975)	-----	
Consenso	(4951)		
		5001	5050
IL13 (EQ) 41BBZeta	(4602)		
CD19Rop_epHIV7	(3975)	-----	
Consenso	(5001)		
		5051	5100
IL13 (EQ) 41BBZeta	(4652)		
CD19Rop_epHIV7	(3975)	-----	
Consenso	(5051)		
		5101	5150
IL13 (EQ) 41BBZeta	(4702)		
CD19Rop_epHIV7	(3975)	-----	
Consenso	(5101)		
		5151	5200
IL13 (EQ) 41BBZeta	(4752)	TCTAGACCCGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATAATCAA	
CD19Rop_epHIV7	(3975)	-----GACCCGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATAATCAA	
Consenso	(5151)	GACCCGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATAATCAA	
		5201	5250
IL13 (EQ) 41BBZeta	(4802)	CCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACATATGT	
CD19Rop_epHIV7	(4019)	CCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACATATGT	
Consenso	(5201)	CCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACATATGT	
		5251	5300
IL13 (EQ) 41BBZeta	(4852)	TGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATG	

ES 2 738 705 T3

CD19Rop_epHIV7	(4069)	TGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATG	
Consenso	(5251)	TGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATG	5301 5350
IL13 (EQ) 41BBZeta	(4902)	CTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGG	
CD19Rop_epHIV7	(4119)	CTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGG	
Consenso	(5301)	CTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGG	5351 5400
IL13 (EQ) 41BBZeta	(4952)	TTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGT	
CD19Rop_epHIV7	(4169)	TTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGT	
Consenso	(5351)	TTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGT	5401 5450
IL13 (EQ) 41BBZeta	(5002)	GGTGTGCACTGTGTTTGTCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCA	
CD19Rop_epHIV7	(4219)	GGTGTGCACTGTGTTTGTCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCA	
Consenso	(5401)	GGTGTGCACTGTGTTTGTCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCA	5451 5500
IL13 (EQ) 41BBZeta	(5052)	CCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCC	
CD19Rop_epHIV7	(4269)	CCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCC	
Consenso	(5451)	CCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCC	5501 5550
IL13 (EQ) 41BBZeta	(5102)	ACGGCGGAACATCATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCG	
CD19Rop_epHIV7	(4319)	ACGGCGGAACATCATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCG	
Consenso	(5501)	ACGGCGGAACATCATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCG	5551 5600
IL13 (EQ) 41BBZeta	(5152)	GCTGTTGGGCACCTGACAATTCGCTGGTGTGTGTCGGGAAATCATCGTCT	
CD19Rop_epHIV7	(4369)	GCTGTTGGGCACCTGACAATTCGCTGGTGTGTGTCGGGAAATCATCGTCT	
Consenso	(5551)	GCTGTTGGGCACCTGACAATTCGCTGGTGTGTGTCGGGAAATCATCGTCT	5601 5650
IL13 (EQ) 41BBZeta	(5202)	TTCCTTGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCC	
CD19Rop_epHIV7	(4419)	TTCCTTGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCC	
Consenso	(5601)	TTCCTTGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCC	5651 5700
IL13 (EQ) 41BBZeta	(5252)	TTCTGTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCCTTCCCGCGG	
CD19Rop_epHIV7	(4469)	TTCTGTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCCTTCCCGCGG	
Consenso	(5651)	TTCTGTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCCTTCCCGCGG	5701 5750
IL13 (EQ) 41BBZeta	(5302)	CCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGA	
CD19Rop_epHIV7	(4519)	CCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGA	
Consenso	(5701)	CCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGA	5751 5800
IL13 (EQ) 41BBZeta	(5352)	CGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCATCGATAACCGTCGACTA	
CD19Rop_epHIV7	(4569)	CGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCATCGATAACCGTCGACTA	
Consenso	(5751)	CGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCATCGATAACCGTCGACTA	5801 5850
IL13 (EQ) 41BBZeta	(5402)	GCCGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCA	
CD19Rop_epHIV7	(4619)	GCCGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCA	
Consenso	(5801)	GCCGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCA	5851 5900
IL13 (EQ) 41BBZeta	(5452)	CTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATCACTCCCAAAGAA	
CD19Rop_epHIV7	(4669)	CTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATCACTCCCAAAGAA	
Consenso	(5851)	CTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATCACTCCCAAAGAA	5901 5950
IL13 (EQ) 41BBZeta	(5502)	GACAAGATCTGCTTTTTGCCTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATC	
CD19Rop_epHIV7	(4719)	GACAAGATCTGCTTTTTGCCTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATC	
Consenso	(5901)	GACAAGATCTGCTTTTTGCCTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATC	5951 6000

ES 2 738 705 T3

IL13 (EQ) 41BBZeta	(5552)	TGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCA
CD19Rop_epHIV7	(4769)	TGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCA
Consenso	(5951)	TGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCA 6001 6050
IL13 (EQ) 41BBZeta	(5602)	ATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTG
CD19Rop_epHIV7	(4819)	ATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTG
Consenso	(6001)	ATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTG 6051 6100
IL13 (EQ) 41BBZeta	(5652)	ACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATC
CD19Rop_epHIV7	(4869)	ACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATC
Consenso	(6051)	ACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATC 6101 6150
IL13 (EQ) 41BBZeta	(5702)	TCTAGCAGAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGGGGG
CD19Rop_epHIV7	(4919)	TCTAGCAGAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGGGGG
Consenso	(6101)	TCTAGCAGAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGGGGG 6151 6200
IL13 (EQ) 41BBZeta	(5752)	GGCCCGGTACCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGC
CD19Rop_epHIV7	(4969)	GGCCCGGTACCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGC
Consenso	(6151)	GGCCCGGTACCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGC 6201 6250
IL13 (EQ) 41BBZeta	(5802)	CGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCAACCTTA
CD19Rop_epHIV7	(5019)	CGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCAACCTTA
Consenso	(6201)	CGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCAACCTTA 6251 6300
IL13 (EQ) 41BBZeta	(5852)	ATCGCCTTGCGAGCACATCCCCCTTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG
CD19Rop_epHIV7	(5069)	ATCGCCTTGCGAGCACATCCCCCTTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG
Consenso	(6251)	ATCGCCTTGCGAGCACATCCCCCTTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG 6301 6350
IL13 (EQ) 41BBZeta	(5902)	GCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATG
CD19Rop_epHIV7	(5119)	GCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATG
Consenso	(6301)	GCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATG 6351 6400
IL13 (EQ) 41BBZeta	(5952)	GAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAAATTTCGCGTTAAATTTTTGTTA
CD19Rop_epHIV7	(5169)	GAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAAATTTCGCGTTAAATTTTTGTTA
Consenso	(6351)	GAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAAATTTCGCGTTAAATTTTTGTTA 6401 6450
IL13 (EQ) 41BBZeta	(6002)	AATCAGCTCATTTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATA
CD19Rop_epHIV7	(5219)	AATCAGCTCATTTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATA
Consenso	(6401)	AATCAGCTCATTTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATA 6451 6500
IL13 (EQ) 41BBZeta	(6052)	AATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAAC
CD19Rop_epHIV7	(5269)	AATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAAC
Consenso	(6451)	AATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAAC 6501 6550
IL13 (EQ) 41BBZeta	(6102)	AAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAAC
CD19Rop_epHIV7	(5319)	AAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAAC
Consenso	(6501)	AAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAAC 6551 6600
IL13 (EQ) 41BBZeta	(6152)	CGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTT
CD19Rop_epHIV7	(5369)	CGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTT
Consenso	(6551)	CGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTT 6601 6650
IL13 (EQ) 41BBZeta	(6202)	TTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCTAAAGGGAGC
CD19Rop_epHIV7	(5419)	TTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCTAAAGGGAGC
Consenso	(6601)	TTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCTAAAGGGAGC

ES 2 738 705 T3

		6651	6700
IL13 (EQ) 41BBZeta	(6252)	CCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGA	
CD19Rop_epHIV7	(5469)	CCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGA	
Consenso	(6651)	CCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGA	6701 6750
IL13 (EQ) 41BBZeta	(6302)	AGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGG	
CD19Rop_epHIV7	(5519)	AGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGG	
Consenso	(6701)	AGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGG	6751 6800
IL13 (EQ) 41BBZeta	(6352)	TCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAG	
CD19Rop_epHIV7	(5569)	TCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAG	
Consenso	(6751)	TCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAG	6801 6850
IL13 (EQ) 41BBZeta	(6402)	GGCGCGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTG	
CD19Rop_epHIV7	(5619)	GGCGCGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTG	
Consenso	(6801)	GGCGCGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTG	6851 6900
IL13 (EQ) 41BBZeta	(6452)	TTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAAC	
CD19Rop_epHIV7	(5669)	TTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAAC	
Consenso	(6851)	TTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAAC	6901 6950
IL13 (EQ) 41BBZeta	(6502)	CCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAA	
CD19Rop_epHIV7	(5719)	CCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAA	
Consenso	(6901)	CCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAA	6951 7000
IL13 (EQ) 41BBZeta	(6552)	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCTCTGT	
CD19Rop_epHIV7	(5769)	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCTCTGT	
Consenso	(6951)	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCTCTGT	7001 7050
IL13 (EQ) 41BBZeta	(6602)	TTTTGCTCAGCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGT	
CD19Rop_epHIV7	(5819)	TTTTGCTCAGCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGT	
Consenso	(7001)	TTTTGCTCAGCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGT	7051 7100
IL13 (EQ) 41BBZeta	(6652)	TGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATC	
CD19Rop_epHIV7	(5869)	TGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATC	
Consenso	(7051)	TGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATC	7101 7150
IL13 (EQ) 41BBZeta	(6702)	CTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAA	
CD19Rop_epHIV7	(5919)	CTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAA	
Consenso	(7101)	CTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAA	7151 7200
IL13 (EQ) 41BBZeta	(6752)	AGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGC	
CD19Rop_epHIV7	(5969)	AGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGC	
Consenso	(7151)	AGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGC	7201 7250
IL13 (EQ) 41BBZeta	(6802)	AACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCA	
CD19Rop_epHIV7	(6019)	AACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCA	
Consenso	(7201)	AACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCA	7251 7300
IL13 (EQ) 41BBZeta	(6852)	CCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATG	
CD19Rop_epHIV7	(6069)	CCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATG	
Consenso	(7251)	CCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATG	7301 7350
IL13 (EQ) 41BBZeta	(6902)	CAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGA	
CD19Rop_epHIV7	(6119)	CAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGA	

ES 2 738 705 T3

Consenso	(7301)	CAGTGTCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGA	7351	7400
IL13 (EQ) 41BBZeta	(6952)	CAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTGCACAACATGGGG		
CD19Rop_epHIV7	(6169)	CAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTGCACAACATGGGG		
Consenso	(7351)	CAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTGCACAACATGGGG	7401	7450
IL13 (EQ) 41BBZeta	(7002)	GATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCAT		
CD19Rop_epHIV7	(6219)	GATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCAT		
Consenso	(7401)	GATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCAT	7451	7500
IL13 (EQ) 41BBZeta	(7052)	ACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGT		
CD19Rop_epHIV7	(6269)	ACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGT		
Consenso	(7451)	ACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGT	7501	7550
IL13 (EQ) 41BBZeta	(7102)	TGCGCAAACCTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAA		
CD19Rop_epHIV7	(6319)	TGCGCAAACCTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAA		
Consenso	(7501)	TGCGCAAACCTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAA	7551	7600
IL13 (EQ) 41BBZeta	(7152)	TTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTC		
CD19Rop_epHIV7	(6369)	TTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTC		
Consenso	(7551)	TTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTC	7601	7650
IL13 (EQ) 41BBZeta	(7202)	GGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGC		
CD19Rop_epHIV7	(6419)	GGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGC		
Consenso	(7601)	GGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGC	7651	7700
IL13 (EQ) 41BBZeta	(7252)	GTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCC		
CD19Rop_epHIV7	(6469)	GTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCC		
Consenso	(7651)	GTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCC	7701	7750
IL13 (EQ) 41BBZeta	(7302)	CGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACG		
CD19Rop_epHIV7	(6519)	CGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACG		
Consenso	(7701)	CGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACG	7751	7800
IL13 (EQ) 41BBZeta	(7352)	AAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAAC		
CD19Rop_epHIV7	(6569)	AAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAAC		
Consenso	(7751)	AAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAAC	7801	7850
IL13 (EQ) 41BBZeta	(7402)	TGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACCTCAT		
CD19Rop_epHIV7	(6619)	TGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACCTCAT		
Consenso	(7801)	TGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACCTCAT	7851	7900
IL13 (EQ) 41BBZeta	(7452)	TTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGAC		
CD19Rop_epHIV7	(6669)	TTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGAC		
Consenso	(7851)	TTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGAC	7901	7950
IL13 (EQ) 41BBZeta	(7502)	CAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAG		
CD19Rop_epHIV7	(6719)	CAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAG		
Consenso	(7901)	CAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAG	7951	8000
IL13 (EQ) 41BBZeta	(7552)	AAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGC		
CD19Rop_epHIV7	(6769)	AAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGC		
Consenso	(7951)	AAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGC	8001	8050
IL13 (EQ) 41BBZeta	(7602)	TGCTTGCAAAACAAAAAACCCCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTCGGGA		

ES 2 738 705 T3

CD19Rop_epHIV7	(6819)	TGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTCGCGGA	
Consenso	(8001)	TGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTCGCGGA	8051 8100
IL13 (EQ) 41BBZeta	(7652)	TCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGC	
CD19Rop_epHIV7	(6869)	TCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGC	
Consenso	(8051)	TCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGC	8101 8150
IL13 (EQ) 41BBZeta	(7702)	AGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTC	
CD19Rop_epHIV7	(6919)	AGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTC	
Consenso	(8101)	AGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTC	8151 8200
IL13 (EQ) 41BBZeta	(7752)	AAGAACTCTGTAGCACC GCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACC	
CD19Rop_epHIV7	(6969)	AAGAACTCTGTAGCACC GCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACC	
Consenso	(8151)	AAGAACTCTGTAGCACC GCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACC	8201 8250
IL13 (EQ) 41BBZeta	(7802)	AGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAA	
CD19Rop_epHIV7	(7019)	AGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAA	
Consenso	(8201)	AGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAA	8251 8300
IL13 (EQ) 41BBZeta	(7852)	GACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTTCG	
CD19Rop_epHIV7	(7069)	GACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTTCG	
Consenso	(8251)	GACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTTCG	8301 8350
IL13 (EQ) 41BBZeta	(7902)	TGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCT	
CD19Rop_epHIV7	(7119)	TGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCT	
Consenso	(8301)	TGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCT	8351 8400
IL13 (EQ) 41BBZeta	(7952)	ACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGG	
CD19Rop_epHIV7	(7169)	ACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGG	
Consenso	(8351)	ACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGG	8401 8450
IL13 (EQ) 41BBZeta	(8002)	ACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAG	
CD19Rop_epHIV7	(7219)	ACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAG	
Consenso	(8401)	ACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAG	8451 8500
IL13 (EQ) 41BBZeta	(8052)	CTTCCAGGGGGAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCTGGGTTTCGCCA	
CD19Rop_epHIV7	(7269)	CTTCCAGGGGGAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCTGGGTTTCGCCA	
Consenso	(8451)	CTTCCAGGGGGAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCTGGGTTTCGCCA	8501 8550
IL13 (EQ) 41BBZeta	(8102)	CCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCC	
CD19Rop_epHIV7	(7319)	CCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCC	
Consenso	(8501)	CCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCC	8551 8600
IL13 (EQ) 41BBZeta	(8152)	TATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTACGGTTCCCTGGCCTTTTGC	
CD19Rop_epHIV7	(7369)	TATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTACGGTTCCCTGGCCTTTTGC	
Consenso	(8551)	TATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTACGGTTCCCTGGCCTTTTGC	8601 8650
IL13 (EQ) 41BBZeta	(8202)	TGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGA	
CD19Rop_epHIV7	(7419)	TGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGA	
Consenso	(8601)	TGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGA	8651 8700
IL13 (EQ) 41BBZeta	(8252)	TAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAA	
CD19Rop_epHIV7	(7469)	TAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAA	
Consenso	(8651)	TAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAA	8701 8750

ES 2 738 705 T3

IL13 (EQ) 41BBZeta	(8302)	CGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATA
CD19Rop_epHIV7	(7519)	CGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATA
Consenso	(8701)	CGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATA
		8751 8800
IL13 (EQ) 41BBZeta	(8352)	CGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCTGGCA
CD19Rop_epHIV7	(7569)	CGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCTGGCA
Consenso	(8751)	CGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCTGGCA
		8801 8850
IL13 (EQ) 41BBZeta	(8402)	CGACAGGTTTCCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATG
CD19Rop_epHIV7	(7619)	CGACAGGTTTCCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATG
Consenso	(8801)	CGACAGGTTTCCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATG
		8851 8900
IL13 (EQ) 41BBZeta	(8452)	TGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCG
CD19Rop_epHIV7	(7669)	TGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCG
Consenso	(8851)	TGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCG
		8901 8950
IL13 (EQ) 41BBZeta	(8502)	GCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAA
CD19Rop_epHIV7	(7719)	GCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAA
Consenso	(8901)	GCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAA
		8951 9000
IL13 (EQ) 41BBZeta	(8552)	CAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCGAAATTAACCCCTACTAAAGGG
CD19Rop_epHIV7	(7769)	CAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCGAAATTAACCCCTACTAAAGGG
Consenso	(8951)	CAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCGAAATTAACCCCTACTAAAGGG
		9001 9050
IL13 (EQ) 41BBZeta	(8602)	AACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCCTCGAGGTCGAGATCCGG
CD19Rop_epHIV7	(7819)	AACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCCTCGAGGTCGAGATCCGG
Consenso	(9001)	AACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCCTCGAGGTCGAGATCCGG
		9051 9100
IL13 (EQ) 41BBZeta	(8652)	TCGACCAGCAACCATAGTCCCGCCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCCTAA
CD19Rop_epHIV7	(7869)	TCGACCAGCAACCATAGTCCCGCCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCCTAA
Consenso	(9051)	TCGACCAGCAACCATAGTCCCGCCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCCTAA
		9101 9150
IL13 (EQ) 41BBZeta	(8702)	CTCCGCCAGTTTCCGCCCATTTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTT
CD19Rop_epHIV7	(7919)	CTCCGCCAGTTTCCGCCCATTTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTT
Consenso	(9101)	CTCCGCCAGTTTCCGCCCATTTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTT
		9151 9200
IL13 (EQ) 41BBZeta	(8752)	ATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTA
CD19Rop_epHIV7	(7969)	ATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTA
Consenso	(9151)	ATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTA
		9201 9250
IL13 (EQ) 41BBZeta	(8802)	GTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTCGACGGT
CD19Rop_epHIV7	(8019)	GTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTCGACGGT
Consenso	(9201)	GTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTCGACGGT
		9251 9300
IL13 (EQ) 41BBZeta	(8852)	ATCGATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGA
CD19Rop_epHIV7	(8069)	ATCGATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGA
Consenso	(9251)	ATCGATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGA
		9301 9350
IL13 (EQ) 41BBZeta	(8902)	CTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTTCATAGCCCATAT
CD19Rop_epHIV7	(8119)	CTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTTCATAGCCCATAT
Consenso	(9301)	CTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTTCATAGCCCATAT
		9351 9400
IL13 (EQ) 41BBZeta	(8952)	ATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACC
CD19Rop_epHIV7	(8169)	ATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACC
Consenso	(9351)	ATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACC

ES 2 738 705 T3

		9401	9450
IL13 (EQ) 41BBZeta	(9002)	GCCCAACGACCCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAG	
CD19Rop_epHIV7	(8219)	GCCCAACGACCCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAG	
Consenso	(9401)	GCCCAACGACCCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAG	
		9451	9500
IL13 (EQ) 41BBZeta	(9052)	TAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGG	
CD19Rop_epHIV7	(8269)	TAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGG	
Consenso	(9451)	TAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGG	
		9501	9550
IL13 (EQ) 41BBZeta	(9102)	TAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCC	
CD19Rop_epHIV7	(8319)	TAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCC	
Consenso	(9501)	TAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCC	
		9551	9600
IL13 (EQ) 41BBZeta	(9152)	CCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCCAGT	
CD19Rop_epHIV7	(8369)	CCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCCAGT	
Consenso	(9551)	CCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCCAGT	
		9601	9650
IL13 (EQ) 41BBZeta	(9202)	ACATGACCTTATGGGACTTTCCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTC	
CD19Rop_epHIV7	(8419)	ACATGACCTTATGGGACTTTCCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTC	
Consenso	(9601)	ACATGACCTTATGGGACTTTCCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTC	
		9651	9700
IL13 (EQ) 41BBZeta	(9252)	ATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGG	
CD19Rop_epHIV7	(8469)	ATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGG	
Consenso	(9651)	ATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGG	
		9701	9750
IL13 (EQ) 41BBZeta	(9302)	ATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCA	
CD19Rop_epHIV7	(8519)	ATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCA	
Consenso	(9701)	ATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCA	
		9751	9800
IL13 (EQ) 41BBZeta	(9352)	ATGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGT	
CD19Rop_epHIV7	(8569)	ATGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGT	
Consenso	(9751)	ATGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGT	
		9801	9850
IL13 (EQ) 41BBZeta	(9402)	AACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGAATTC	
CD19Rop_epHIV7	(8619)	AACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGAATTC	
Consenso	(9801)	AACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGAATTC	
		9851	9900
IL13 (EQ) 41BBZeta	(9452)	GGAGTGGCGAGCCCTCAGATCCTGCATATAAGCAGCTGCTTTTGCCTGT	
CD19Rop_epHIV7	(8669)	GGAGTGGCGAGCCCTCAGATCCTGCATATAAGCAGCTGCTTTTGCCTGT	
Consenso	(9851)	GGAGTGGCGAGCCCTCAGATCCTGCATATAAGCAGCTGCTTTTGCCTGT	
		9901	9914
IL13 (EQ) 41BBZeta	(9502)	ACTGGGTCTCTCTG	
CD19Rop_epHIV7	(8719)	ACTGGGTCTCTCTG	
Consenso	(9901)	ACTGGGTCTCTCTG	

FIGURA 19

IL13(EmY)-CD8h3-CD8tm2-41BB-Zeta

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPGPVPPSTALRLIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGM

Péptido señal GMCSFRa IL13(EmY)

YCAALESLINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLHLKKLF
REGRFNAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAG

bisagra de CD8 (48 aa)

CD8tm(2)

TCGVLLLSLVITLYKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELGGGRVKFS

4-1BB cito

CD3ζ

RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK

DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Péptido señal GMCSFRa

IL13(EmY)

Bisagra de CD8

Transmembrana de CD8 (2)

4-1BB cito

(Gly)3

Zeta

FIGURA 20

IL13(EmY)-CD8h3-CD28tm-CD28gg-41BB-Zeta

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPGPVPPSTALRLIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGM

Péptido señal GMCSFRa

IL13(EmY)

YCAALESLINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLHLKKLF
REGRFNAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDFWVLVVVG

bisagra de CD8 (48 aa)

CD28tm

GVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSG

CD28gg

GGKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELGGGRVKFSRSADAPAYQ

4-1BB cito

CD3ζ

QGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI

GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Péptido señal GMCSFRa

IL13(EmY)

Bisagra de CD8

Transmembrana de CD28

CD28gg

4-1BB cito

(Gly)3

Zeta

FIGURA 21

IL13(EmY)-IgG4(HL-CH3)-CD4tm-41BB-Zeta

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPGPVPPSTALRYLIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGM
 Péptido señal GMCSFRa IL13(EmY)

YCAALESLINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLHLKKLF

REGRFNESKYGPPCPPCPGGGSSGGGSGGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY
 Bisagra de IgG4 Conector CH3 de IgG4

PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHN

HYTQKSLSLSLGKMALIVLGGVAGLLLFIGLGIFFKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS
 CD4 tm 4-1BB cito

CRFPEEEEEGGCELGGGRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE
 CD3ζ

MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDA

LHMQALPPR

Péptido señal GMCSFRa
 IL13(EmY)
 Bisagra de IgG4
 Conector
 IgG4-Fc-CH3
 Transmembrana CD4
 4-1BB cito
 (Gly)3
 Zeta

FIGURA 22

IL13(EmY)-IgG4(L235E,N297Q)-CD8tm-41BB-Zeta

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPGPVPPSTALRYLIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGM
 Péptido señal GMCSFRa IL13(EmY)

YCAALESLINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLHLKKLF

REGRFNESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF
 IgG4-Fc(SmP)

NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS

KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL

DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLKYIWAPLAGTCGV
 CD8 tm

LLLSLVITKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELGGGRVKFSRSADAP
 4-1BB cito CD3ζ

AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA

YSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Péptido señal GMCSFRa
 IL13(EmY)
 IgG4-Fc(SmP)
 Transmembrana CD8
 4-1BB cito
 (Gly)3
 Zeta

FIGURA 23

IL13(EmY)-Linker-CD28tm-CD28gg-41BB-Zeta

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPGPVPPSTALR  LIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGM
 Péptido señal GMCSFRa IL13(EmY)

YCAALESLINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLHLKKLF

REGRFNGGGSSGGGSGMFWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRGGHSDYMN
 Conector CD28(M) tm CD28gg

TPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSGGGKRGKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP
 4-1BB cito

EEEEGGCELGGGRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGK
 CD3ζ

PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ

ALPPR

Péptido señal GMCSFRa
 IL13(EmY)
 Conector
 Transmembrana CD28(M)
 CD28gg
 4-1BB cito
 (Gly)3
 Zeta

FIGURA 24

IL13(EmY)-HL-CD28m-CD28gg-41BB-Zeta

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPGPVPPSTALR~~Y~~LIEELVNITQ~~N~~QKAPLCNGSMVWSINLTAGM
 Péptido señal GMCSFRa IL13(EmY)

YCAALESLINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLHLKKLF

REGRFNESKYGPPC~~P~~PCPGGGSSGGGSGMFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRS
 Bisagra de IgG4 Conector CD28(M) tm
 CD28gg

RGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSGGGKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT
 4-1BB cito

TQEEDGCSCRFPEEEEGGCELGGGRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK
 CD3ζ

RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTA

TKDTYDALHMQALPPR

Péptido señal GMCSFRa
 IL13(EmY)
 Bisagra de IgG4
 Conector
 Transmembrana CD28(M)
 CD28gg
 4-1BB cito
 (Gly)3
 Zeta

Figura 25

IL13(EmY)-IgG4(HL-CH3)-CD28tm-CD28gg-41BB-Zeta

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPGPVPPSTALRYLIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGM
 Péptido señal GMCSFRa IL13(EmY)

YCAALESLINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLHLKKLF

REGRFNESKYGPPCPPCPGGGSSGGGSGGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY
 Bisagra de IgG4 Conector CH3 de IgG4

PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN

HYTQKSLSLSLGKMFVVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRGGHSDYMNMTPRRP
 CD28(M) tm CD28gg

GPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSGGGKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG
 4-1BB cito

GCELGGGRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK
 CD3ζ

NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP

R

Péptido señal GMCSFRa
 IL13(EmY)
 Bisagra de IgG4
 Conector
 CH3 de IgG4
 Transmembrana CD28
 CD28gg
 4-1BB cito
 (Gly)3
 Zeta

FIGURA 26

IL13(EmY)-IgG4(L235E,N297Q)-CD28tm-CD28gg-41BB-Zeta

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPGPVPPSTALR Y LIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGM
 Péptido señal GMCSFRa IL13(EmY)

YCAALESLINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLHLKKLF

REGRFNESKYGPPCP P CPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF
 IgG4-Fc(L235E,N297Q)

NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS

KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL

DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLKMF FWVLVVG GV
 CD28(M) tm

LACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSGGG
 CD28gg

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL GGGRVKFSRSADAPAYQQG
 4-1BB cito CD3ζ

QNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG

MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Péptido señal GMCSFRa
 IL13(EmY)
 IgG4-Fc(L235,N297Q)
 Transmembrana CD28(M)
 CD28gg
 (Gly)3
 4-1BB cito
 (Gly)3
 Zeta

FIGURA 27

IL13(EmY)-CD8h3-CD8tm-41BB-Zeta

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPGPVPPSTALR~~Y~~LIEELVNITQ~~N~~QKAPLCNGSMVWSINLTAGM

Péptido señal GMCSFRa IL13(EmY)

YCAALESLINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLHLKKLF
REGRFNAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAG

bisagra de CD8 (48 aa)

CD8tm

TCGVLLLSLVITGGGKRGGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELGGGRVK

4-1BB cito

CD3ζ

FSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ
KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Péptido señal GMCSFRa
IL13(EmY)
Bisagra de CD8
Transmembrana CD8
(Gly)3
4-1BB cito
(Gly)3
Zeta