Titolo: METODO E COMPOSIZIONI PER IMMUNOTERAPIA CELLULARE

DESCRIZIONE

Campo dell'invenzione

[0001] La presente invenzione si riferisce al campo della biomedicina e specificamente a metodi utili per la terapia del cancro. In particolare, forme di realizzazione dell'invenzione si riferiscono a metodi e composizioni per condurre un'immunoterapia cellulare comprendente cellule T modificate con recettori di bersagliamento tumorale.

Fondamento dell'invenzione

[0002] Il trasferimento adottivo di linfociti T umani ingegnerizzati mediante trasferimento genico per esprimere recettori chimerici di antigeni (recettori chimerici) specifici per le molecole di superficie espresse sulle cellule tumorali ha il potenziale per trattare efficacemente le malignità avanzate. I recettori chimerici sono recettori sintetici che includono un dominio legante il ligando extracellulare, più comunemente un frammento variabile a catena singola di un anticorpo monoclonale (scFv) collegato a componenti di segnalazione intracellulare, più comunemente CD3ζ singolarmente o combinato con uno o

più domini costimolatori. Gran parte della ricerca nella progettazione di recettori chimerici si è concentrata sulla definizione di scFv e altri elementi leganti il ligando che bersagliano le cellule maligne senza causare grave tossicità ai tessuti normali essenziali e sulla definizione della composizione ottimale dei moduli di segnalazione intracellulare per attivare le funzioni effettrici delle cellule T. Tuttavia, non è chiaro se le variazioni nella progettazione del recettore chimerico che mediano una funzione in vitro superiore si tradurranno in modo riproducibile in una migliore attività terapeutica in vivo nelle applicazioni cliniche delle cellule T modificate con recettore chimerico.

[0003] È necessario identificare metodi per determinare gli elementi della progettazione del recettore chimerico che sono importanti per l'attività terapeutica e le popolazioni cellulari da modificare geneticamente e trasferire adottivamente che forniscono una maggiore sopravvivenza ed efficacia in vivo.

[0004] Hudeck et al., descrivono studi che coinvolgono cellule T modificate per esprimere recettori chimerici di antigeni specifici per l'antigene associato al tumore delle cellule B ROR1.

[0005] Brian et al., descrivono studi clinici che coinvolgono cellule T modificate per esprimere i recettori chimerici di cellule T specifici per CD20.

[0006] Koehler et al., discutono il possibile trattamento della leucemia linfocitica cronica a cellule B mediante terapia adottiva con cellule T usando cellule T ingegnerizzate per esprimere un recettore chimerico di antigeni che si lega a CD 19.

[0007] Cheadle et al., descrivono l'efficacia anti-tumorale di un recettore chimerico di antigeni specifico per CD19 di topo contro linfoma a cellule B in vitro e in vivo.

[0008] WO 02/077029 A2 si riferisce a cellule immunitarie specifiche per CD19 geneticamente modificate per l'immunoterapia di malignità $CD19^+$.

Sommario dell'invenzione

[0009] La presente invenzione fornisce un acido nucleico di recettore chimerico comprendente:

a) un polinucleotide codificante un dominio legante il ligando, in cui il dominio legante il ligando si lega a un ligando, in cui il ligando è una molecola specifica per tumore, una molecola virale o qualsiasi altra molecola espressa su una popolazione di cellule bersaglio che è adatta a mediare il riconoscimento e

l'eliminazione da parte di un linfocita, in cui il polinucleotide codifica una singola catena Fv avente la sequenza amminoacidica

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTS
RLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLE
ITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYG
VSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSL
QTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS

che lega specificamente CD19;

b) un polinucleotide codificante un distanziatore polipeptidico di una lunghezza che è specifica per il ligando, in cui il distanziatore fornisce una maggiore proliferazione delle cellule T e/o la produzione di citochine in risposta al ligando rispetto a un recettore chimerico di riferimento, in cui il distanziatore ha una lunghezza di 15 amminoacidi o inferiore e comprende la sequenza amminoacidica ESKYGPPCPPCP;

c) un polinucleotide codificante un dominio transmembrana, in cui il dominio transmembrana comprende la sequenza amminoacidica MFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV di un dominio transmembrana CD28; e

d) un polinucleotide codificante un dominio di segnalazione intracellulare, in cui il dominio di

segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare 4-1BB e un dominio di segnalazione di CD3zeta, avente la sequenza amminoacidica
KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADA PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA LPPR.

[0010] L'invenzione fornisce anche un polipeptide di recettore chimerico codificato da un acido nucleico di recettore chimerico dell'invenzione.

[0011] L'invenzione fornisce anche un vettore di espressione comprendente un acido nucleico di recettore chimerico isolato dell'invenzione.

[0012] L'invenzione fornisce anche una cellula ospite comprendente un acido nucleico dell'invenzione o un vettore di espressione dell'invenzione.

[0013] L'invenzione fornisce anche una composizione comprendente una cellula ospite dell'invenzione in un eccipiente farmaceuticamente accettabile.

[0014] L'invenzione fornisce anche una cellula ospite dell'invenzione o una composizione dell'invenzione, per uso nel trattamento di un cancro o di un'infezione virale; facoltativamente in cui il cancro è un tumore solido o una malignità ematologica.

[0015] Le forme di realizzazione dell'invenzione sono descritte in alcuni dei seguenti casi.

[0016] Un esempio si riferisce a metodi e composizioni per conferire e/o potenziare le risposte immunitarie mediate dall'immunoterapia cellulare, per esempio trasferendo adottivamente sottoinsiemi geneticamente modificati specifici per tumore e di cellule T CD8+ o CD4+ singolarmente o in combinazione. In altri casi vi sono acidi nucleici di recettore chimerico e vettori e cellule ospite che includono tali acidi nucleici. La sequenza di acido nucleico che codifica il recettore chimerico collega insieme una serie di componenti modulari che possono essere asportati e sostituiti con altri componenti al fine di personalizzare il recettore chimerico per un'efficiente attivazione delle cellule T e il riconoscimento di una specifica molecola bersaglio o di un epitopo sulla molecola bersaglio.

[0017] In alcuni casi, un acido nucleico di recettore chimerico comprende un polinucleotide codificante un dominio legante il ligando, in cui il ligando è una molecola espressa su cellule maligne o infette, un polinucleotide codificando un distanziatore polipeptidico in cui il distanziatore polipeptidico è di circa 200 amminoacidi o meno, un polinucleotide

codificante un dominio transmembrana; e un polinucleotide codificante domini di segnalazione intracellulare. In alcuni casi, il distanziatore polipeptidico comprende una regione cerniera IgG4 modificata contenente una sequenza amminoacidica X_1PPX_2P che può essere collegata ad altre sequenze amminoacidiche incluse in via non limitativa le sequenze CH2 e CH3 o soltanto CH3 dell'Fc di Ig. È stato sorprendentemente riscontrato che la lunghezza della regione distanziatrice che si ipotizza non abbia capacità di segnalazione influisce sull'efficacia in vivo delle cellule T modificate per esprimere il recettore chimerico e deve essere personalizzata per singole molecole bersaglio per un riconoscimento ottimale di un tumore o una cellula bersaglio.

[0018] In altri casi un acido nucleico di recettore chimerico isolato comprende: un polinucleotide codificante un dominio legante il ligando, in cui il ligando è un antigene specifico per tumore, un antigene virale o qualsiasi altra molecola espressa su una popolazione di cellule bersaglio che sia adatta a mediare il riconoscimento e l'eliminazione da parte di un linfocita; un polinucleotide codificante un distanziatore polipeptidico in cui il distanziatore

polipeptidico è di una lunghezza personalizzata che è specifica per ciascun ligando bersagliato, in cui il distanziatore fornisce una maggiore proliferazione delle cellule T e/o produzione di citochine rispetto a un recettore chimerico di riferimento; un polinucleotide codificante un dominio transmembrana; e un polinucleotide codificante uno o più domini di segnalazione intracellulari. In alcuni casi, viene impiegato un distanziatore lungo se l'epitopo sul ligando bersaglio è in una posizione prossimale alla membrana e un distanziatore corto viene impiegato se l'epitopo sul ligando bersaglio è in una posizione distale alla membrana. Alcuni casi includono vettori di espressione e cellule ospite comprendenti il recettore chimerico isolato come descritto nella presente.

[0019] In altri casi, un polipeptide di recettore chimerico comprende un dominio legante il ligando, in cui il ligando è un antigene specifico per tumore, un antigene virale o qualsiasi altra molecola che è espressa su una popolazione di cellule bersaglio e può essere bersagliato per mediare il riconoscimento e l'eliminazione da parte dei linfociti; un distanziatore polipeptidico in cui il distanziatore polipeptidico è di circa 10-229 amminoacidi; un dominio transmembrana;

e uno o più domini di segnalazione intracellulari. In alcuni casi, il distanziatore polipeptidico comprende una regione cerniera IgG modificata contenente la sequenza amminoacidica X_1PPX_2P.

[0020] In altri casi vi sono composizioni per conferire e/o potenziare le risposte immunitarie mediate da immunoterapia cellulare, per esempio trasferendo in modo adottivo un sottoinsieme di cellule T CD4+ geneticamente modificate specifiche per tumore, in cui le cellule T CD4+ conferiscono e/o aumentano la capacità delle cellule T CD8+ di sostenere la reattività anti-tumorale e aumentare e/o massimizzare la proliferazione specifica per tumore. In alcuni casi, le cellule CD4+ sono geneticamente modificate per esprimere un acido nucleico di recettore chimerico e/o un polipeptide di recettore chimerico come descritto nella presente.

[0021] In altri casi vi sono composizioni per conferire e/o potenziare le risposte immunitarie mediate da immunoterapia cellulare, per esempio trasferendo in modo adottivo un sottoinsieme di cellule T CD8+ geneticamente modificate specifiche per tumore. In alcuni casi, le cellule CD8+ esprimono un acido nucleico di recettore chimerico e/o un polipeptide di

recettore chimerico come descritto nella presente.

[0022] In un altro caso, una composizione di immunoterapia cellulare adottiva avente una preparazione cellulare di linfociti T citotossici CD8+ geneticamente modificati per conferire e/o potenziare risposte immunitarie, in cui la preparazione cellulare di linfociti T citotossici comprende cellule T CD8+ che esprimono un recettore chimerico comprendente un dominio legante il ligando per un ligando associato alla malattia o disturbo, una regione distanziatrice personalizzata, un dominio transmembrana; e un dominio di segnalazione intracellulare di una cellula T o altri recettori, come un dominio co-stimolatorio, e/o una preparazione cellulare di linfociti T helper geneticamente modificati, in cui la preparazione cellulare di linfociti T helper ha cellule T CD4+ che esprimono un recettore chimerico comprendente un dominio variabile anticorpale specifico per il ligando associato alla malattia o disturbo, una regione distanziatrice personalizzata, un dominio transmembrana; e uno o più domini di segnalazione intracellulari.

[0023] In un caso vi è un metodo per effettuare immunoterapia cellulare in un soggetto affetto da una

malattia o disturbo somministrando al soggetto una preparazione cellulare di linfociti T citotossici geneticamente modificati che fornisce una risposta immunitaria cellulare, in cui la preparazione cellulare di linfociti T citotossici comprende cellule T CD8+ che hanno un recettore chimerico comprendente un polinucleotide codificante un dominio legante il ligando, in cui il ligando è un antigene specifico per tumore, un antigene virale o qualsiasi altra molecola espressa su una popolazione di cellule bersaglio che sia adatta a mediare il riconoscimento e l'eliminazione da parte di un linfocita; un polinucleotide codificante un distanziatore polipeptidico in cui il distanziatore polipeptidico è di una lunghezza personalizzata che è specifica per ciascun ligando bersagliato, in cui il distanziatore fornisce una maggiore proliferazione delle cellule T e/o produzione di citochine rispetto a un recettore chimerico di riferimento; un polinucleotide codificante un dominio transmembrana; e un polinucleotide codificante uno o più domini di segnalazione intracellulari. In alcuni casi, il dominio legante il ligando è un dominio variabile anticorpale extracellulare specifico per un ligando associato alla malattia o al disturbo. Un caso include una

preparazione cellulare di linfociti T helper geneticamente modificati in cui la preparazione cellulare di linfociti T helper comprende cellule T CD4+ che hanno un recettore chimerico comprendente un polinucleotide codificante un dominio legante il ligando, in cui il ligando è un antigene specifico per tumore, un antigene virale o qualsiasi altra molecola espressa su una popolazione di cellule bersaglio che sia adatta a mediare il riconoscimento e l'eliminazione da parte di un linfocita; un polinucleotide codificante un distanziatore polipeptidico in cui il distanziatore polipeptidico è di una lunghezza personalizzata che è specifica per ciascun ligando bersagliato, in cui il distanziatore fornisce una maggiore proliferazione delle cellule T e/o produzione di citochine rispetto a un recettore chimerico di riferimento; un polinucleotide codificante un dominio transmembrana; e un polinucleotide codificante uno o più domini di segnalazione intracellulari. In alcuni casi, la popolazione di cellule CD8+ geneticamente modificate e CD4+ geneticamente modificate vengono co-somministrate. In alcuni casi, le cellule T sono cellule T autologhe o allogeniche.

[0024] Sono possibili varie modifiche del metodo di cui

sopra. Per esempio, il recettore chimerico espresso dalla cellula T CD4+ e quello dalla cellula T CD8+ può essere uguali o differenti tra loro.

[0025] In un altro un metodo per produrre una composizione immunoterapica adottiva ottenendo una preparazione cellulare di linfociti T citotossici CD8+ specifici per tumore modificati con recettore chimerico che stimola una risposta immunitaria cellulare ed esprime un recettore chimerico reattivo con un antigene, in cui la preparazione cellulare di linfociti T citotossici modificati comprende cellule T CD8+ che hanno un recettore chimerico comprendente un dominio legante il ligando, in cui il ligando è un antigene specifico per tumore, un antigene virale o qualsiasi altra molecola espressa su una popolazione di cellule bersaglio che sia adatta a mediare il riconoscimento e l'eliminazione da parte di un linfocita; un distanziatore polipeptidico in cui il distanziatore polipeptidico è di una lunghezza personalizzata che è specifica per ciascun ligando bersagliato, in cui il distanziatore fornisce una maggiore proliferazione delle cellule T e/o produzione di citochine rispetto a un recettore chimerico di riferimento; un dominio transmembrana; e uno o più domini di segnalazione

intracellulari; e/o ottenere una cellula helper CD4+ T modificata memoria o naïve in cui la preparazione cellulare di linfociti T helper modificati comprende cellule CD4+ che hanno un recettore chimerico comprendente un dominio legante il ligando, in cui il ligando è un antigene specifico per tumore, un antigene virale o qualsiasi altra molecola espressa su una popolazione di cellule bersaglio che sia adatta a mediare il riconoscimento e l'eliminazione da parte di un linfocita; un distanziatore polipeptidico in cui il distanziatore polipeptidico è di una lunghezza personalizzata che è specifica per ciascun ligando bersagliato, in cui il distanziatore fornisce una maggiore proliferazione delle cellule T e/o produzione di citochine rispetto a un recettore chimerico di riferimento; un dominio transmembrana; e sono descritti uno o più domini di segnalazione intracellulari.

[0026] Questi e altri casi sono descritti ulteriormente nella specifica, nei disegni e nelle rivendicazioni allegati.

BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI

[0027]

Figura 1 Libreria di sequenze distanziatrici. Abbiamo costruito una libreria di plasmidi che contiene

sequenze di DNA ottimizzate per codone che codificano componenti extracellulari includenti solo la cerniera IgG4, la cerniera IgG4 collegata ai domini CH2 e CH3 o la cerniera IgG4 collegata al dominio CH3. Qualsiasi sequenza scFV (VH e VL) può essere clonata in 5' nelle sequenze codificanti questa libreria di domini distanziatori variabili. I domini distanziatori sono a loro volta collegati ai domini transmembrana CD28 e di segnalazione intracellulare e a CD3 zeta. Una sequenza T2A nel vettore separa il recettore chimerico da un marcatore selezionabile codificante un recettore del fattore di crescita epidermico umano troncato (tEGFR).

Figura 2: Citotossicità *in vitro*, produzione di citochine e proliferazione di cellule T modificate per esprimere recettori chimerici ROR1 2A2 con lunghezza del distanziatore modificata. (A) Fenotipo di linee cellulari derivate da ^{T}CM CD8$_{+}$ purificate modificate con ciascuno dei recettori chimerici ROR1 2A2 con dominio distanziatore lungo, intermedio e corto. La colorazione con anticorpo anti-F(ab) che si lega a un epitopo nello scFV 2A2 mostra l'espressione di superficie dei recettori chimerici ROR1 con distanziatore troncato o a lunghezza intera. (B) Attività citolitica delle cellule T esprimenti i vari

recettori chimerici ROR1 2A2 con distanziatore lungo (●), intermedio (▲) e corto (◆) o un vettore lentivirale di controllo tEGFR contro $ROR1^+$ (x) e cellule bersaglio di controllo. Il diagramma a barre riassume i dati di citotossicità di 3 esperimenti indipendenti (E:T = 30:1) normalizzati rispetto all'attività citolitica dal recettore chimerico ROR1 2A2 "lungo" = 1 e analizzati mediante test t di Student. (C) La diluizione del colorante CFSE è stata usata per misurare la proliferazione delle cellule T con recettore chimerico ROR1 2A2 e tEGFR di controllo, 72 ore dopo la stimolazione con cellule Raji/ROR1 (pannello sinistro) e CLL primarie (pannello destro) senza aggiunta di citochine esogene. Per l'analisi, i pozzetti in triplicato sono stati raggruppati e la proliferazione di cellule T (PI^-), $CD8^+$ vive è stata analizzata. I numeri sopra ciascun istogramma indicano il numero di divisioni cellulari che il sottoinsieme proliferante subiva e la frazione di cellule T in ciascun gate che subiva divisioni cellulari ≥4/3/2/1 è fornita accanto a ciascun diagramma. (D) Saggio multiplex di citochine di supernatanti ottenuti dopo 24 ore da co-colture in triplicato di $5x10^4$ cellule T esprimenti i vari recettori chimerici ROR1 2A2 con

cellule Raji/ROR1 e CLL primarie. I dati delle citochine multiplex da 3 esperimenti indipendenti sono stati normalizzati (rilascio di citochine da parte del recettore chimerico ROR1 2A2 “lungo” = 1) e analizzati mediante test t di Student (diagramma a barre di destra).

Figura 3. Il recettore chimerico R11 richiede un distanziatore lungo per il riconoscimento di cellule tumorali ROR1$^+$. Le sequenze codificanti scFV dall’anticorpo monoclonale R11 che è specifico per un epitopo nel dominio di Kringle prossimale alla membrana del recettore tirosin chinasico orfano ROR1 sono state clonate a monte delle sequenze di solo cerniera IgG4 (corta), cerniera IgG4/CH3 (intermedia) e cerniera IgG4/CH2/CH3 nella nostra libreria di recettori chimerici contenente i domini costimolatori 4-1BB e preparati come vettori lentivirali. A). Cellule T CD8$^+$ umane sono state trasdotte e l’efficienza di trasduzione con ciascuno dei recettori chimerici corti, intermedi e lunghi è stata determinata mediante colorazione per il marcatore tEGFR. B). Le cellule T trasdotte esprimenti il corto (in alto), l’intermedio (al centro) e il lungo (in basso) sono state saggiate per la lisi delle cellule di leucemia K562 da sole o

trasfettate per esprimere ROR1. Soltanto le cellule T esprimenti il recettore chimerico con distanziatore lungo hanno ucciso in modo efficiente le cellule K562 ROR1+. C). Le cellule T trasdotte esprimenti il corto (in alto), l'intermedio (al centro) e il lungo (in basso) sono state etichettate con CFSE, stimolate con cellule K562 esprimenti ROR1 o CD19 (controllo) e saggiate per la proliferazione cellulare nell'arco di 72 ore. Le cellule T esprimenti il recettore chimerico con distanziatore lungo proliferarono specificamente a cellule ROR1+ K562. D). Le cellule T trasdotte esprimenti il corto (in alto), l'intermedio (al centro) e il lungo (in basso) sono state stimolate con cellule di linfoma Raji e cellule K562 che esprimevano ROR1 o CD19 (controllo) e saggiate per la secrezione di interferone gamma nel supernatante nell'arco di 24 ore. I linfociti T esprimenti il recettore chimerico con distanziatore lungo proliferavano e producevano i più elevati livelli di interferone gamma in risposta alle cellule bersaglio positive a ROR1.

Figura 4: Progettazione di recettori chimerici ROR1 con lunghezza del distanziatore modificata e derivati da 2A2 e R12 scFV con affinità differente (A) Progettazione di inserti di transgene lentivirali

codificanti un pannello di recettori chimerici ROR1 contenenti il 2A2 scFV, un distanziatore derivato da IgG4-Fc di "Cerniera-CH2-CH3" (distanziatore lungo, 229 AA), "Cerniera-CH3" (intermedio, 119 AA), o soltanto "Cerniera" (corto, 12 AA) e un modulo di segnalazione con CD3ζ e CD28. Ciascuna cassetta di recettore chimerico contiene un marcatore EGFR troncato codificato a valle di un elemento T2A. (B) Inserti di transgeni lentivirali codificanti recettori chimerici specifici per ROR1 derivati da scFV R12 e 2A2 con un distanziatore corto "Cerniera" IgG4-Fc (12 AA) e un modulo di segnalazione contenente rispettivamente CD28 o 4-1BB e CD3ζ (totale: 4 costrutti).

Figura 5: Reattività anti-tumorale delle cellule T modificate con recettori chimerici ROR1 derivati da mAb R12 con affinità superiore a 2A2. (A) espressione di tEGFR su linee di cellule T derivate da T^{CM} $CD8_+$ policlonali purificate modificate con ciascuno dei recettori chimerici ROR1 2A2 e R12 con un distanziatore corto IgG4-Fc "Cerniera" e dominio co-stimolatorio CD28 o 4-1BB. (B) Citotossicità contro cellule bersaglio $ROR1^+$ e di controllo da parte di cellule T esprimenti R12 (28- ▲; 4-1BB-Δ) e recettori chimerici ROR1 2A2 (28- ●; 4-1BB ○) o un vettore di controllo tEGFR (x).

(C) Saggio multiplex di citochine di supernatanti ottenuti dopo 24 ore da co-colture di $5x10^4$ cellule T esprimenti i vari recettori chimerici ROR1 con cellule tumorali Raji/ROR1. I diagrammi a barre centrale/destro mostrano i dati multiplex normalizzati da 3 esperimenti indipendenti (rilascio di citochine da parte del recettore chimerico ROR1 2A2 = 1) analizzati mediante test t di Student. (D) La proliferazione delle cellule T con recettore chimerico ROR1 e delle cellule T di controllo tEGFR 72 ore dopo la stimolazione con cellule Raji/ROR1 e senza aggiunta di citochine esogene è stata valutata mediante diluizione del colorante CFSE. I numeri sopra ciascun istogramma indicano il numero di divisioni cellulari che il sottoinsieme proliferante subiva e la frazione di cellule T in ciascun gate che subiva divisioni cellulari ≥4/3/2/1 è fornita sopra ciascun diagramma.

Figura 6: Analisi della produzione di citochine e proliferazione di linee di cellule T $CD4^+$ modificate con un recettore chimerico ROR1 derivato da mAb R12 con affinità maggiore di 2A2. (AB) I recettori chimerici ROR1 2A2 e R12 avevano il distanziatore corto e un dominio co-stimolatorio CD28. (A) Analisi multiplex di citochine da supernatanti ottenuti 24 ore dopo la

stimolazione di $5x10^4$ cellule T $CD4^+$ esprimenti il recettore chimerico ROR1 2A2 e R12 con cellule tumorali Raji/ROR1. **(B)** La proliferazione di cellule T $CD4^+$ con recettore chimerico R12 e ROR1 2A2 e cellule T di controllo tEGFR 72 ore dopo la stimolazione con cellule Raji/ROR1 e senza aggiunta di citochine esogene è stata valutata mediante diluizione del colorante CFSE. I numeri sopra ciascun istogramma indicano il numero di divisioni cellulari che il sottoinsieme proliferante subiva e la frazione di cellule T in ciascun gate che subiva divisioni cellulari ≥5/4/3/2/1 è fornita sopra gli istogrammi.

Figura 7: Riconoscimento di CLL primaria da parte di cellule T modificate con recettori chimerici ROR1 2A2 e R12 con distanziatore corto ottimale e dominio co-stimolatorio 4-1BB o con recettore chimerico specifico per CD19. (A) Espressione di ROR1/CD19 su CLL primaria e CD80/86 su CLL primaria e cellule tumorali Raji/ROR1 (grafici a punti neri) che possono impegnare CD28 sulle cellule T di recettore chimerico (istogrammi bianchi). La colorazione con mAb di controllo dell'isotipo abbinato viene mostrata come grafici/istogrammi a punti grigi. (B) Attività citolitica delle cellule T esprimenti il recettore chimerico 2A2 (●) e ROR1 R12

(■), un recettore chimerico specifico per CD19 (▲) e cellule T modificate con un vettore di controllo tEGFR (x) contro CLL primaria (diagramma a sinistra) e cellule B normali (diagramma a destra) analizzata mediante saggio di rilascio di cromo. I dati di citotossicità contro CLL primaria da 4 esperimenti indipendenti (E:T = 30:1) sono stati normalizzati (attività citolitica dal recettore chimerico ROR1 2A2 = 1) e analizzati mediante test t di Student (diagramma a barre). (C) Analisi di citochine multiplex dopo una stimolazione di 24 ore di $5x10^4$ cellule T con recettore chimerico con cellule CLL primarie. Il rilascio di citochine di cellule T con recettore chimerico non stimolato era inferiore a 3,6 pg/ml (limite di rilevamento) (diagramma a barre a sinistra). ELISA per la produzione di IFN-γ di $5x10^4$ cellule T di recettore chimerico ROR1 2A2 e R12 dopo una co-coltura di 24 ore con CLL primaria. D.O. di 1 corrisponde a circa 250 pg/ml (diagramma a barre di destra). (D) Proliferazione di cellule T $CD8^+$ modificate con ROR1 2A2, ROR1 R12 e un recettore chimerico CD19, 72 ore dopo la stimolazione con cellule CLL primarie. I numeri sopra ciascun istogramma indicano il numero di divisioni cellulari e la frazione di cellule T in ciascun gate

che subiva divisioni cellulari ≥3/2/1 è fornita accanto a ciascun grafico.

Figura 8: La funzione di cellule T $CD8^+$ modificate con recettore chimerico ROR1 e recettore chimerico CD19 contro CLL primaria è potenziata da cellule T helper $CD4^+$ modificate con recettore chimerico. (A) ELISA per la produzione di IL-2 da co-colture in triplicato di $5x10^4$ cellule T $CD8^+$ e $CD4^+$ esprimenti rispettivamente il recettore chimerico ROR1 R12 e CD19, incubate con CLL primaria per 24 ore. D.O. di 1 corrisponde a circa 800 pg/ml. **(B)** La proliferazione di cellule T $CD8^+$ modificate con recettore chimerico in risposta a CLL primaria è potenziata dall'aggiunta di cellule T $CD4^+$ modificate con recettore chimerico. Cellule T $CD8^+$ etichettate con CFSE esprimenti rispettivamente il recettore chimerico ROR1 2A2, ROR1 R12 e CD19, sono state co-coltivate con cellule tumorali e con cellule T $CD4^+$ trasdotte con recettore chimerico ROR1 2A2, ROR1 R12 e CD19 o non trasdotte di controllo ($CD8^+$:$CD4^+$ = 1:1). La proliferazione del sottoinsieme $CD8^+$ è stata analizzata 72 ore dopo la stimolazione. I numeri sopra ciascun istogramma indicano il numero di divisioni cellulari e la frazione di cellule T in ciascun gate che subiva divisioni cellulari ≥3/2/1 è fornita sopra

ciascun grafico.

Figura 9: Efficacia anti-tumorale in vivo di cellule T con recettore chimerico ROR1 2A2, ROR1 R12 e CD19. Coorti di topi sono state inoculate con $0,5x10^6$ MCL JeKo-1/ffluc tramite iniezione nella vena della coda e $5x10^6$ cellule T con recettore chimerico ROR1 2A2, ROR1 R12 o CD19, o cellule T esprimenti un vettore di controllo tEGFR sono state somministrate 7 giorni dopo l'inoculo del tumore. Tutti i costrutti di recettore chimerico avevano il distanziatore corto IgG4 "solo cerniera" e un dominio co-stimolatorio 4-1BB. (A, B) Rappresentazione per immagini di bioluminescenza seriale del tumore in coorti di topi trattati con cellule T esprimenti il recettore chimerico ROR1 2A2 (▼), il recettore chimerico ROR1 R12 ad alta affinità (■), un recettore chimerico specifico per CD19 (▲), con cellule T trasdotte soltanto con tEGFR (●) e topi non trattati. L'imaging con bioluminescenza mostrava manifestazioni tumorali nel midollo osseo e nel torace e quindi l'intensità del segnale è stata misurata nelle regioni di interesse che racchiudevano l'intero corpo e il torace di ogni singolo topo. (C) Analisi di Kaplan-Meier della sopravvivenza nel trattamento individuale e nei gruppi di controllo. Le analisi statistiche sono

state effettuate usando il test dei ranghi logaritmici. I dati mostrati in A–C sono rappresentativi dei risultati ottenuti in 2 esperimenti indipendenti. (D) Proliferazione delle cellule T con recettore chimerico ROR1 2A2, ROR1 R12 e CD19 *in vivo.* I topi recanti tumore NSG/JeKo-1 ricevevano una singola dose di $5x10^6$ cellule T con recettore chimerico ROR1 2A2, ROR1 R12 o CD19 marcate con CFSE al giorno 7 dopo l'inoculo del tumore e 72 ore dopo sono stati raccolti sangue periferico, midollo osseo e milza da ogni singolo topo. La frequenza e la proliferazione di cellule T $CD45^+$ $CD8^+$ $tEGFR^+$ vive (PI^-) è stata analizzata. La frequenza di cellule T con recettore chimerico ROR1 2A2, ROR1 R12 e CD19 rispettivamente è fornita a sinistra di ciascun istogramma come percentuale di cellule vive, e la frazione di cellule T che subivano divisioni cellulari ≥4/3/2/1 è fornita sopra ciascun grafico.

Figura 10 Espressione di ligandi ROR1 e NKG2D su linee cellulari di cancro epiteliale. (A) Espressione di ROR1 sulle linee cellulari di cancro mammario triplo negativo MDA-MB-231 e 468 e sulle linee di cancro a cellule renali FARP, TREP e RWL (istogrammi neri). La colorazione con l'anticorpo di controllo dell'isotipo abbinato viene mostrata come istogrammi grigi. (B)

Espressione di CD80/86 e di ligandi NKG2D MICA/B su cellule tumorali MDA-MB-231 e Raji/ROR1 e NKG2D (CD314) su cellule T con recettore chimerico ROR1 2A2 e R12. La colorazione con mAb di controllo dell'isotipo abbinato viene mostrata come grafici/istogrammi a punti grigi.

Figura 11: Le cellule T modificate con recettore chimerico ROR1 riconoscono cellule tumorali epiteliali ROR1$^+$ *in vitro.* (A) Saggio di rilascio di cromo per valutare l'attività citolitica delle cellule T modificate con recettore chimerico ROR1 R12 (distanziatore corto/dominio co-stimolatorio 4-1BB, simboli chiusi) e delle cellule T di controllo tEGFR (simboli aperti) contro linee di cancro mammario e cancro a cellule renali ROR1$^+$. (A-D) I recettori chimerici ROR1 2A2 e R12 avevano il distanziatore corto ottimale e un dominio co-stimolatorio 4-1BB. (B) Analisi di citochine multiplex dopo la stimolazione di cellule T esprimenti il recettore chimerico ROR1 2A2 e R12 con cellule tumorali MDA-MB-231 e Raji/ROR1. (C) proliferazione di cellule T CD8$^+$ modificate con i recettori chimerici ROR1 2A2 e R12 72 ore dopo la stimolazione con cellule tumorali MDA-MB-231. Per l'analisi, i pozzetti in triplicato sono stati raggruppati e la proliferazione di cellule T CD8$^+$ vive

(PI^-) è stata analizzata. I numeri sopra ciascun istogramma indicano il numero di divisioni cellulari che il sottoinsieme proliferante subiva e la frazione di cellule T in ciascun gate che subiva divisioni cellulari ≥4/3/2/1 è fornita accanto a ciascun istogramma. (D) ELISA per la produzione di IL-2 da parte delle cellule T con recettore chimerico ROR1 R12 dopo una co-coltura di 24 ore con MDA-MB-231 in terreno normale e dopo l'aggiunta di un cocktail di anticorpi che blocca la via NKG2D [anti-NKG2D (clone 1D11), anti-MICA/B (clone 6D4) e anti-ULBP] o mAb di controllo abbinati per isotipo. D.O. di 0,6 corrisponde a circa 1900 pg/ml.

Figura 12. Effetto della lunghezza del distanziatore extracellulare sul riconoscimento e l'attivazione della lisi delle cellule tumorali da parte delle cellule T CD8+ umane che esprimono un recettore chimerico specifico per HER2. A.) Raffigurazione della posizione dell'epitopo Fab di Herceptin sull'epitopo prossimale alla membrana cellulare tumorale su HER2 umano, **B.)** Formati strutturali delle varianti di lunghezza di distanziatore CAR di scFv Herceptin come polipeptidi legati a -T2A con la proteina transmembrana del marcatore carbossil EGFRt, **C.)** Rilevamento mediante

Western blot dell'espressione della variante Herceptin-CAR con distanziatore corto, medio e lungo in CTL CD8+ umani, **D.)** Rilevamento citometrico a flusso di EGFRt da CTL CD8+ umani trasdotti, trasdotti con varianti CAR di Herceptin quindi purificati in modo immunomagnetico mediante biotina-Herceptin, micropalline anti-biotina, E.) Funzione citolitica distinta da cellule T trasdotte per esprimere le varianti CAR di Herceptin (corto – S; medio – M; e lungo – L) contro linee cellulari di medulloblastoma umano Med411FH e D283 $HER2^{+}$ (D341 è una linea cellulare di controllo $HER2^{-}$ di medulloblastoma, i diagrammi di flusso inseriti sono linee bersaglio tumorali colorate con mAb specifico anti-HER2). Verde = IgG4 intera (distanziatore lungo, ▼), Blu = IgG4cerniera: CH3 (distanziatore medio; ▲), Rosso = solo cerniera IgG4 (Distanziatore corto; ■).

Figura 13: Vettori del recettore chimerico CD19 e generazione di cellule T con recettore chimerico CD19. **(A)** Progettazione di inserti di transgene lentivirali codificanti un pannello di recettori chimerici specifici per CD19 che differiscono per lunghezza del distanziatore extracellulare e costimolazione intracellulare. Ogni recettore chimerico codificava il frammento variabile a catena singola specifico del CD19

derivato dal mAb FMC63 in un orientamento VL–VH, un dominio distanziatore derivato da IgG4 di Cerniera–CH2–CH3 (distanziatore lungo, 229 AA) o solo cerniera (distanziatore corto, 12 AA), e un modulo di segnalazione contenente CD3ζ con CD28 o 4–1BB singolarmente o in tandem. Ciascuna cassetta di recettore chimerico contiene un marcatore EGFR troncato codificato a valle di un elemento 2A clivabile. **(B, C)** Le linee cellulari T policlonali modificate con ciascuno dei costrutti di recettore chimerico CD19 sono state preparate da cellule T memoria centrali $CD8^+$ $CD45RO^+$ $CD62L^+$ (T_{CM}) purificate di donatori normali. Dopo la trasduzione lentivirale, le cellule T positive al transgene in ciascuna linea cellulare sono state purificate usando il marcatore tEGFR ed espanse per esperimenti in vitro e in vivo. **(D)** La MFI dopo la colorazione per il marcatore tEGFR mostra un'espressione di transgene equivalente nelle cellule T modificate con ciascuno dei recettori chimerici CD19.

Figura 14: Citotossicità in vitro, produzione di citochine e proliferazione di cellule T modificate con recettori chimerici CD19 distinti. (A) Attività citolitica delle cellule T esprimenti i vari recettori chimerici CD19 contro cellule bersaglio $CD19^+$ e di

controllo. **(B)** Saggio di citochine multiplex di supernatanti ottenuti dopo 24 ore da co-colture in triplicato di cellule T esprimenti i vari recettori chimerici CD19 e cellule K562 trasfettate con cellule Raji CD19 e $CD19^+$. **(C)** Confronto della produzione di citochine da parte di cellule T esprimenti i vari recettori chimerici CD19. I dati di citochine multiplex da 6 esperimenti indipendenti sono stati normalizzati (rilascio di citochine da parte di CTL con recettore chimerico CD19 "corto/CD28" = 1) e analizzati mediante test t di Student. **(D)** La diluizione del colorante CFSE è stata usata per misurare la proliferazione delle cellule T con recettore chimerico CD19 72 ore dopo la stimolazione con K562/CD19 (pannello superiore) e cellule tumorali Raji $CD19^+$ (pannello inferiore) senza aggiunta di citochine esogene. Per l'analisi, i pozzetti in triplicato sono stati raggruppati e la proliferazione di cellule T (PI^-), $CD8^+$ vive analizzate. I numeri sopra ciascun istogramma indicano il numero di divisioni cellulari che il sottoinsieme proliferante subiva e la frazione di cellule T in ciascun gate che subivano divisioni cellulari ≥ 4/3/2/1 è fornita in alto a sinistra di ciascun diagramma. **(E)** La colorazione PI è stata effettuata alla fine di una

co-coltura di 72 ore di cellule T esprimenti i vari recettori chimerici CD19 con cellule tumorali Raji. La percentuale di cellule PI^+ all'interno della linea di cellule T con recettore chimerico ($CD3^+$) è fornita in ciascun istogramma.

Figura 15: Le cellule T con recettore chimerico CD19 con un dominio distanziatore extracellulare corto eradicano i tumori Raji in topi NOD/SCID. (A) Coorti di topi sono state inoculate con Raji-ffluc tramite iniezione nella vena della coda e le cellule T trasdotte con recettori chimerici CD19 contenenti domini distanziatori lunghi e corti o con solo tEGFR sono state somministrate 2 e 9 giorni dopo l'inoculazione del tumore mediante iniezione nella vena della coda. La progressione e la distribuzione del tumore sono state valutate mediante rappresentazione per immagini di bioluminescenza seriale dopo l'iniezione di substrato di luciferina. **(B)** Rappresentazione per immagini seriale di bioluminescenza del tumore in coorti di topi trattati con cellule T esprimenti recettori chimerici CD19 con distanziatore corto ("corto/CD28" e "corto/4-1BB") e lungo ("lungo/CD28" e "lungo/4-1BB"), con cellule T trasdotte con il vettore di controllo tEGFR o non

trattate. Ciascun diagramma che rappresenta le coorti di topi trattati con il recettore chimerico CD19 o le cellule T trasdotte da tEGFR mostra anche la media della progressione del tumore nei topi non trattati per confronto (triangoli rossi). **(C)** Analisi di Kaplan-Meier della sopravvivenza di topi non trattati e topi trattati con cellule T esprimenti recettori chimerici CD19 con distanziatore corto ("corto/CD28" e "corto/4-IBB"), distanziatore lungo ("lungo/CD28' e "lungo/4-1BB") e con tEGFR di controllo. Le analisi statistiche sono state effettuate usando il test dei ranghi logaritmici. I dati mostrati in **B e C** sono rappresentativi dei risultati ottenuti in 3 esperimenti indipendenti.

Figura 16: Le cellule T con recettore chimerico CD19 con un distanziatore corto (corto/4-1BB) eradicano i tumori Raji instaurati in topi NSG in modo dipendente dalla dose. (A) I topi sono stati inoculati con Raji-ffluc tramite iniezione nella vena della coda e l'attecchimento del tumore è stato confermato mediante rappresentazione per immagini di bioluminescenza al giorno 6. Al giorno 7, i topi ricevevano una singola iniezione e.v. di varie dosi di cellule T trasdotte con il recettore chimerico CD19 "corto/4-1BB" o con il

lentivirus di controllo-tEGFR. **(B, C)** Efficacia anti-tumorale dipendente dalla dose delle cellule T esprimenti il recettore chimerico CD19 “corto/4-1BB”. Una coorte di controllo di topi ha ricevuto una singola dose elevata di cellule T modificate con il solo tEGFR. **(D)** Persistenza delle cellule T con recettore chimerico CD19 dopo il trasferimento adottivo in topi NSG/Raji. Analisi citometrica a flusso del sangue periferico (sanguinamento oculare) nella coorte di topi trattati con $2,5x10^6$ cellule T con recettore chimerico CD19 “corto/4-1BB”. La frequenza cellule T $CD8^+tEGFR^+$ è mostrata come percentuale di cellule di sangue periferico vive.

Figura 17: Le cellule T esprimenti i recettori chimerici CD19 con un distanziatore corto e CD28 o 4-1BB sono più efficaci contro il linfoma instaurato rispetto a quelle esprimenti i recettori chimerici CD19 con un distanziatore lungo. **(A)** Topi NSG sono stati inoculati con Raji-ffluc al giorno 0 e trattati il giorno 7 con una dose di $2,5x10^6$ cellule T di recettore chimerico CD19 esprimenti distanziatore corto o lungo e dominio co-stimolatorio CD28 o 4-1BB. **(B)** Analisi di Kaplan-Meier della sopravvivenza dei topi in ciascuno dei gruppi di trattamento. Le analisi statistiche sono

state effettuate usando il test dei ranghi logaritmici. **(C)** Rappresentazione per immagini di bioluminescenza di coorti di topi trattati con cellule T esprimenti recettori chimerici CD19 con distanziatori corti ("corto/CD28" e "corto/4-1BB") e lunghi ("lungo/CD28 e" lungo/4-1BB"). Il carico tumorale medio osservato nei topi non trattati in corrispondenza di ciascun punto temporale è mostrato in ciascun diagramma per confronto (triangoli). **(D)** La persistenza in vivo delle cellule T esprimenti il recettore chimerico CD19 con dominio distanziatore corto è migliorata rispetto alle cellule T esprimenti recettori chimerici CD19 con dominio distanziatore lungo. La frequenza di cellule T $CD8^+$ $tEGFR^+$ nel sangue periferico ottenuto al giorno 3 e 10 dopo il trasferimento è stata determinata mediante citometria a flusso ed è mostrata come percentuale di cellule di sangue periferico vive (PI^-). Le analisi statistiche sono state effettuate mediante test t di Student. I dati mostrati in **B-D** sono rappresentativi dei risultati ottenuti in 3 esperimenti indipendenti.

Figura 18: L'aumento della dose di cellule T con recettore chimerico o l'aumento della segnalazione costimolatoria non migliora l'efficacia anti-tumorale dei recettori chimerici CD19 con un dominio

distanziatore lungo contro il linfoma instaurato. (A) Attività citolitica dei linfociti T esprimenti i recettori chimerici CD19 “lungo/CD28”, “lungo/4-1BB” e “lungo/CD28_4-1BB” contro cellule bersaglio $CD19^+$ e di controllo. **(B)** Saggio di citochine multiplex del supernatante ottenuto dopo 24 ore da co-colture in triplicato di cellule tumorali K562/CD19 e Raji con cellule T esprimenti i vari recettori chimerici CD19. **(C)** Valutazione della proliferazione delle cellule T con recettore chimerico CD19 72 ore dopo la stimolazione con cellule tumorali $CD19^+$ (K562/CD19 – pannello di sinistra; Raji – pannello di destra) mediante diluizione del colorante CFSE. Per l’analisi, i pozzetti in triplicato sono stati raggruppati e la proliferazione di cellule T $CD8^+$ vive (PI^-) è stata analizzata. I numeri sopra ciascun istogramma indicano il numero di divisioni cellulari che il sottoinsieme proliferante subiva e la frazione di cellule T in ciascun gate che subiva divisioni cellulari ≥ 4/3/2/1 è fornita in alto a sinistra di ciascun diagramma. **(D)** Analisi di Kaplan-Meier della sopravvivenza di topi trattati con cellule T esprimenti recettori chimerici CD19 con dominio distanziatore corto (“corto/CD28”) e lungo (“lungo/CD28” e “lungo/CD28_4-1BB”) o cellule T

modificate con un vettore lentivirale di controllo codificante tEGFR. Le analisi statistiche sono state effettuate usando il test dei ranghi logaritmici. **(E)** Rappresentazione per immagini di bioluminescenza di coorti di topi trattati con cellule T esprimenti recettori chimerici CD19 con distanziatore corto ("corto/CD28") e distanziatore lungo ("lungo/CD28 e" lungo/CD28_4-1BB "). I diagrammi mostrano la progressione media del tumore nei topi non trattati per confronto (triangoli rossi). **(F) Persistenza** *in vivo* di linfociti T esprimenti i vari recettori chimerici CD19. La frequenza di cellule T $CD8^+$ $tEGFR^+$ nel sangue periferico ottenuto al giorno 3 e 10 dopo il trasferimento è stata determinata mediante citometria a flusso ed è mostrata come percentuale di cellule di sangue periferico vive (PI^-). Le analisi statistiche sono state effettuate mediante test t di Student.

Figura 19: Le cellule T con recettore chimerico CD19 con un dominio distanziatore lungo vengono attivate dal tumore in vivo ma non riescono ad aumentare in numero di cellule. (A) Espressione di CD69 e CD25 su cellule T modificate con ciascun recettore chimerico CD19 prima del trasferimento in topi NSG/Raji. **(B)** Coorti di topi sono state inoculate con cellule tumorali Raji-ffluc e

7 giorni dopo ricevevano cellule T trasdotte con recettore chimerico CD19 marcato con CFSE o di controllo. Midollo osseo e milza sono stati raccolti da sottogruppi di topi 24 e 72 ore dopo la somministrazione di cellule T. **(C, D)** Analisi citometrica a flusso multiparametrica di cellule mononucleate di midollo osseo ottenute 24 ore (C) e 72 ore (D) dopo il trasferimento delle cellule T. I diagrammi a punti mostrano la colorazione anti CD3 e anti CD45 dopo gating su cellule PI^- per rilevare cellule T umane vitali. Il gate $CD3^-$ $CD45^+$ contiene cellule tumorali Raji. L'espressione di CD25 e CD69 su cellule T $CD3^+$ $CD45^+$ vive (PI^-) è mostrata negli istogrammi. **(E)** Frequenza di cellule T $CD3^+$ $CD45^+$ in milze ottenute 24 e 72 ore dopo il trasferimento delle cellule T. I diagrammi a punti sono sottoposti a gating (filtraggio) rispetto a splenociti vivi PI^- e la percentuale di cellule T $CD3^+$ $CD45^+$ è mostrata in ciascun grafico. **(F)** Colorazione PI di midollo osseo e splenociti ore dopo il trasferimento di cellule T in topi NSG/Raji. I numeri negli istogrammi indicano la percentuale di cellule PI^+ all'interno della popolazione $CD3^+$. (G) Rappresentazione per immagini di bioluminescenza di coorti di topi trattati con cellule

T esprimenti recettori chimerici CD19 con distanziatore corto (“corto/CD28” e “corto/4-1BB”), distanziatori lunghi (“lungo/CD28” e “lungo/4-1BB”) o cellule T di controllo.

Figura 20: Le cellule T esprimenti recettori chimerici CD19 con 4-1BB e CD3zeta e una cerniera IgG4-Fc modificata mostrano una funzione in vitro e in vivo superiore rispetto alle cellule T esprimenti recettori chimerici CD19 con 4-1BB e CD3zeta e una cerniera alfa CD8. A. Attività citolitica delle cellule T modificate con recettore chimerico CD19 con cerniera Fc IgG4, cerniera CD8 alfa e cellule T di controllo contro cellule K562 etichettate con Cr^{51} trasfettate con CD19, cellule di linfoma Raji che esprimono CD19 e cellule T K562 di controllo. La lisi è mostrata a differenti rapporti E/T in un saggio di rilascio di Cr^{51} di 4 ore. B. Produzione di interferone gamma di $5x10^4$ cellule T esprimenti un recettore chimerico CD19 con cerniera Fc IgG4 o cerniera CD8 alfa dopo una co-coltura di 24 ore con cellule tumorali Raji. D.O. di 1 corrisponde a ~ 500 pg/ml di interferone gamma. C. Saggio di diluizione del colorante CFSE per misurare la proliferazione di cellule T esprimenti un recettore chimerico CD19 con cerniera Fc IgG4 o cerniera CD8 alfa e cellule T

esprimenti tEGFR da sole (controllo) dopo 72 ore di co-coltura con cellule di linfoma Raji positive a CD19. I numeri sopra ciascun istogramma indicano il numero di divisioni cellulari subite dal sottoinsieme di cellule proliferanti. La frazione di cellule T in ciascun gate che subiva divisioni cellulari ≥3/2/1 è fornita accanto al diagramma. D. Attività anti-tumorale in vivo delle cellule T esprimenti un recettore chimerico CD19 con cerniera Fc IgG4 (gruppo 1) o cerniera CD8 alfa (gruppo 2) e cellule T che esprimono tEGFR da solo (gruppo 3) in topi NSG inoculati con cellule tumorali Raji esprimenti luciferasi di lucciola (ffluc). I topi sono stati sottoposti a imaging 17 giorni dopo l'inoculazione del tumore e 10 giorni dopo l'inoculazione delle cellule T. I dati mostrano un carico tumorale maggiore nei topi trattati con cellule T di controllo tEGFR (gruppo 3) o con cellule T CD8 chimeriche con recettore chimerico CD8 (gruppo 2) rispetto ai topi trattati con cellule T con recettore chimerico CD19 IgG4 Fc cerniera (gruppo 1).

Descrizione dettagliata

[0028] Se non definito diversamente, tutti i termini tecnici e scientifici usati nella presente hanno un significato identico a quello comunemente inteso da una

persona mediamente esperta nel ramo alla quale appartiene questa invenzione.

[0029] “Circa” come usato nella presente quando si fa riferimento a un valore misurabile è destinato a racchiudere variazioni di ± 20% o ± 10%, più preferibilmente ± 5%, ancora più preferibilmente ± 1%, e ancora più preferibilmente ± 0,1% dal valore specificato.

[0030] “Attivazione”, come usato nella presente, si riferisce allo stato di una cellula T che è stata stimolata a sufficienza per indurre una proliferazione cellulare rilevabile, produzione di citochine o espressione di marcatori di superficie cellulare come CD69 e CD25, o funzioni effettori rilevabili.

[0031] “Morte cellulare indotta da attivazione” come usato nella presente si riferisce a uno stato di una cellula T che è attivata ma non è in grado di proliferare per più di 2 generazioni e mostra marcatori di apoptosi.

[0032] “Antigene” o “Ag” come usato nella presente si riferisce a una molecola che provoca una risposta immunitaria. Questa risposta immunitaria può coinvolgere la produzione di anticorpi o l’attivazione di cellule immunologicamente competenti specifiche, o

entrambi. È prontamente evidente che un antigene può essere generato sintetizzato, prodotto in modo ricombinante o può essere derivato da un campione biologico. Tale campione biologico può includere, in via non limitativa, un campione di tessuto, un campione di tumore, una cellula o un fluido biologico.

[0033] “Effetto anti-tumorale” come usato nella presente, si riferisce a un effetto biologico, che può essere manifestato da una diminuzione del volume tumorale, una diminuzione del numero di cellule tumorali, una diminuzione del numero di metastasi, un aumento dell’aspettativa di vita, o una diminuzione di vari sintomi fisiologici associati alla condizione cancerosa. Un “effetto anti-tumorale” può anche manifestarsi con una diminuzione della recidiva o un aumento del tempo prima della recidiva.

[0034] “Recettore chimerico” come usato nella presente si riferisce a un recettore progettato sinteticamente comprendente un dominio legante il ligando di un anticorpo o altra sequenza proteica che si lega a una molecola associata alla malattia o al disturbo ed è collegato tramite un dominio distanziatore a uno o più domini di segnalazione intracellulari di una cellula T o altri recettori, come un dominio co-stimolatorio.

[0035] “Dominio co-stimolatorio”, come il termine viene usato nella presente, si riferisce a una porzione di segnalazione che fornisce alle cellule T un segnale che, oltre al segnale primario fornito per esempio dalla catena CD3 zeta del complesso TCR/CD3, media una risposta a cellule T, incluse, in via non limitativa, attivazione, proliferazione, differenziazione, secrezione di citochine e simili. Un dominio co-stimolatorio può includere tutto o una parte di, in via non limitativa, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, ICOS, antigene 1 associato alla funzione linfocitaria (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 e un ligando che si lega specificatamente a CD83. In alcuni casi, il dominio co-stimolatorio è un dominio di segnalazione intracellulare che interagisce con altri mediatori intracellulari per mediare una risposta cellulare inclusa attivazione, proliferazione, differenziazione e secrezione di citochine e simili.

[0036] “Codifica” come usato nella presente si riferisce alla proprietà di sequenze specifiche di nucleotidi in un polinucleotide, come un gene, un cDNA o un mRNA, di fungere da modelli per la sintesi di altre macromolecole come una sequenza definita di amminoacidi. Pertanto, un gene codifica una proteina se

trascrizione e traslazione di un mRNA corrispondente a questo gene producono la proteina in una cellula o in un altro sistema biologico. Una “sequenza di acido nucleico codificante un polipeptide” include tutte le sequenze nucleotidiche che sono versioni degenerate l’una dell’altra e che codificano la stessa sequenza amminoacidica.

[0037] “Linfocita T citotossico” (CTL) come usato nella presente si riferisce a un linfocita T che esprime CD8 sulla sua superficie (vale a dire una Cellula T $CD8^+$). In alcuni casi, tali cellule sono preferibilmente cellule T “memoria” (cellule T_M) che hanno esperienza con l’antigene.

[0038] Cellule T “memoria centrale” (o “T_{CM} “) come usato nella presente si riferisce a una CTL con esperienza con l’antigene che esprime CD62L o CCR-7 e CD45RO sulla sua superficie e non esprime o ha una ridotta espressione di CD45RA rispetto alle cellule naïve. In alcuni casi, le cellule memoria centrali sono positive all’espressione di CD62L, CCR7, CD28, CD127, CD45RO e CD95 e hanno una ridotta espressione di CD54RA rispetto alle cellule naïve.

[0039] Cellula T “memoria effettrici” (o “T_{EM}“) come usato nella presente si riferisce a un linfocita T con

esperienza con l'antigene che non esprime o ha un'espressione ridotta di CD62L sulla sua superficie rispetto a cellule memoria centrali, e non esprime o ha un'espressione ridotta di CD45RA rispetto alla cellula naïve. In alcuni casi, le cellule di memoria effettrici sono negative all'espressione di CD62L e CCR7, rispetto alle cellule naïve o alle cellule memoria centrali, e hanno un'espressione variabile di CD28 e CD45RA.

[0040] I linfociti T "naïve" come usato nella presente si riferiscono a un linfocita T senza antigene che esprime CD62L e CD45RA, e non esprime CD45RO- rispetto alle cellule memoria centrali o effettrici. In alcuni casi, i linfociti T CD8+ naïve sono caratterizzati dall'espressione di marcatori fenotipici di cellule T naïve tra cui CD62L, CCR7, CD28, CD127 e CD45RA.

[0041] Cellule T "effettrici", "T_E" come usato nella presente si riferiscono a cellule di linfociti T citotossici con esperienza con l'antigene che non esprimono o hanno un'espressione ridotta di CD62L, CCR7, CD28 e sono positive a granzima B e perforina rispetto alle cellule T memoria centrale o naïve.

[0042] "Arricchito" e "impoverito" come usato nella presente per descrivere quantità di tipi di cellule in una miscela si riferisce al sottoporre la miscela di

cellule a un processo o fase che ha come risultato un aumento del numero del tipo “arricchito” e una diminuzione del numero delle cellule “impoverite”. Pertanto, a seconda della sorgente della popolazione originale di cellule sottoposte al processo di arricchimento, una miscela o composizione può contenere circa il 60, 70, 80, 90, 95 o 99 percento o più (in numero o conteggio) di cellule "arricchite" e circa il 40, 30, 20, 10, 5 o 1 percento o meno (in numero o conteggio) delle cellule ”esaurite“.

[0043] “Epitopo” come usato nella presente si riferisce a una parte di un antigene o molecola che è riconosciuta dal sistema immunitario inclusi anticorpi, cellule T e/o cellule B. Gli epitopi solitamente hanno almeno 7 amminoacidi e possono essere lineari o conformazionali.

[0044] “Isolato,” quando usato per descrivere i vari polipeptidi descritti nella presente, indica un polipeptide o acido nucleico che è stato identificato e separato e/o recuperato da un componente del suo ambiente naturale. Preferibilmente, il polipeptide o l’acido nucleico isolato è privo di associazione con tutti i componenti con cui è naturalmente associato. I componenti contaminanti del suo ambiente naturale sono

materiali che tipicamente interferirebbero con gli usi diagnostici o terapeutici per il polipeptide o l'acido nucleico, e possono includere enzimi, ormoni, e altri soluti proteinacei o non proteinacei.

[0045] "Dominio di segnalazione intracellulare" come usato nella presente si riferisce a tutto o una porzione di uno o più domini di una molecola (nella presente la molecola del recettore chimerico) che fornisce l'attivazione di un linfocita. I domini intracellulari di tali molecole mediano un segnale interagendo con i mediatori cellulari per provocare proliferazione, differenziazione, attivazione e altre funzioni effettive. In alcuni casi, tali molecole includono tutte o porzioni di CD28, CD3, 4-1BB e relative combinazioni.

[0046] "Ligando" come usato nella presente si riferisce a una sostanza che si lega specificamente a un'altra sostanza per formare un complesso. Esempi di ligandi includono epitopi su antigeni, molecole che si legano a recettori, substrati, inibitori, ormoni e attivatori. "Dominio legante l'antigene" come usato nella presente si riferisce alla sostanza o alla porzione di una sostanza che si lega a un ligando. Esempi di domini leganti l'antigene includono porzioni di legame con

l’antigene di anticorpi, domini extracellulari di recettori e siti attivi di enzimi.

[0047] “Collegato operativamente” come usato nella presente si riferisce al collegamento funzionale tra una sequenza regolatrice e una sequenza di acido nucleico eterologa risultante nell’espressione di quest’ultima. Per esempio, una prima sequenza di acido nucleico è legata operativamente con una seconda sequenza di acido nucleico quando la prima sequenza di acido nucleico è posta in una relazione funzionale con la seconda sequenza di acido nucleico. Per esempio, un promotore è legato operativamente a una sequenza codificante se il promotore incide sulla trascrizione o sull’espressione della sequenza codificante. Generalmente, le sequenze di DNA legate operativamente sono contigue e, laddove necessario per unire due regioni codificanti la proteina, nella stessa cornice di lettura.

[0048] “Identità di sequenza amminoacidica percentuale (%)” rispetto alle sequenze polipeptidiche del recettore chimerico nella presente identificate è definita come la percentuale di residui amminoacidici in una sequenza candidata che sono identici ai residui amminoacidici nella sequenza di riferimento per

ciascuno dei dominio leganti ligandi, distanziatore, dominio transmembrana e/o il dominio di attivazione di linfociti, dopo aver allineato le sequenze e introdotto gap (spazi vuoti), se necessario, per ottenere la massima identità di sequenza percentuale, e non considerando eventuali sostituzioni conservative come parte dell'identità di sequenza. L'allineamento ai fini della determinazione dell'identità di sequenza amminoacidica percentuale può essere ottenuto in svariati modi che rientrano nelle competenze del ramo, ad esempio, usando software informatici pubblicamente disponibili come BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o il software Megalign (DNASTAR). Gli esperti nel ramo possono determinare parametri appropriati per misurare l'allineamento, incluso un qualsiasi algoritmo necessario per ottenere un allineamento massimale sull'intera lunghezza delle sequenze che vengono comparate. Per esempio, i valori di identità % di sequenza amminoacidica generati usando il programma informatico WU-BLAST-2 [Altschul et al., Methods in Enzymology, 266:460-480 (1996)] usa svariati parametri di ricerca, molti dei quali sono impostati ai valori predefiniti. Quelli che non sono impostati ai valori predefiniti (vale a dire i parametri regolabili)

vengono impostati con i seguenti valori: span (estensione) di sovrapposizione = 1, frazione di sovrapposizione = 0,125, soglia di parola (T) = 11 e matrice di punteggio = BLOSUM62. Un valore di identità di sequenza amminoacidica % viene determinato dividendo (a) il numero di residui amminoacidici identici corrispondenti tra ciascuna o tutte le sequenze amminoacidiche polipeptidiche della sequenza del recettore chimerico di riferimento fornita nella Tabella 2 e della sequenza amminoacidica di confronto di interesse determinata mediante WU-BLAST-2 per (b) il numero totale di residui amminoacidici del polipeptide di interesse.

[0049] “Polinucleotide variante di recettore chimerico” o “sequenza di acido nucleico variante di recettore chimerico” come usato nella presente si riferisce a una molecola di acido nucleico codificante un polipeptide come definito di seguito avente almeno l’80% circa di identità di sequenza di acido nucleico con la sequenza acida polinucleotidica mostrata nella Tabella 1 o un relativo frammento derivato in modo specifico, come un polinucleotide codificante un dominio legante l’antigene, un polinucleotide codificante un dominio distanziatore, un polinucleotide codificante un dominio

transmembrana e/o un polinucleotide codificante un dominio stimolatorio dei linfociti. Normalmente, una variante di recettore chimerico del polinucleotide o un relativo frammento avrà almeno circa l'80% di identità di sequenza di acido nucleico, più preferibilmente almeno circa l'81% di identità di sequenza di acido nucleico, più preferibilmente almeno circa l'82% di identità di sequenza di acido nucleico, più preferibilmente a almeno circa l'83% di identità di sequenza di acido nucleico, più preferibilmente almeno circa l'84% di identità di sequenza di acido nucleico, più preferibilmente almeno circa l'85% di identità di sequenza di acido nucleico, più preferibilmente almeno circa l'86% di identità di sequenza di acido nucleico, più preferibilmente almeno circa 87% di identità della sequenza di acido nucleico, più preferibilmente almeno circa l'88% di identità della sequenza di acido nucleico, più preferibilmente almeno circa l'89% di identità della sequenza di acido nucleico, più preferibilmente almeno circa il 90% di identità della sequenza di acido nucleico, più preferibilmente almeno circa il 91% identità di sequenza di acido nucleico, più preferibilmente almeno circa il 92% di identità di sequenza di acido nucleico, più preferibilmente almeno

circa il 93% di sequenza di acido nucleico identità, più preferibilmente almeno circa il 94% di identità di sequenza di acido nucleico, più preferibilmente almeno circa il 95% di identità di sequenza di acido nucleico, più preferibilmente almeno circa il 96% di identità di sequenza di acido nucleico, più preferibilmente almeno circa il 97% di identità di sequenza di acido nucleico, più preferibilmente almeno circa il 98% di identità di sequenza di acido nucleico e ancora più preferibilmente almeno circa il 99% di identità di sequenza di acido nucleico rispetto alla sequenza di acido nucleico come mostrato nella Tabella o a un relativo frammento derivato. Le varianti non comprendono la sequenza nucleotidica nativa. A questo proposito, a causa della degenerazione del codice genetico, un esperto del ramo riconoscerà immediatamente che un gran numero di polinucleotidi varianti di recettori chimerici aventi almeno circa l'80% di identità di sequenza di acido nucleico rispetto alla sequenza nucleotidica della Tabella 1 codificheranno un polipeptide avente una sequenza amminoacidica che è identica alla sequenza amminoacidica della Tabella 2.

[0050] "Sostanzialmente purificato" si riferisce a una molecola che è essenzialmente priva di altri tipi di

molecole o una cellula che è essenzialmente priva di altri tipi di cellule. Una cellula sostanzialmente purificata si riferisce anche a una cellula, che è stata separata da altri tipi di cellule con cui è normalmente associata nel suo stato naturale. In alcuni casi, una popolazione di cellule sostanzialmente purificate si riferisce a una popolazione omogenea di cellule.

[0051] “Sostanzialmente non trovato” quando usato in riferimento alla presenza di un antigene tumorale o altre molecole su cellule normali si riferisce alla percentuale di un tipo di cellula normale che ha l’antigene o la molecola, e/o alla densità dell’antigene sulle cellule. In alcuni casi, sostanzialmente non trovato significa che l’antigene o la molecola si trova su meno del 50% del tipo di cellula normale e/o con una densità del 50% in meno rispetto alla quantità di cellule o antigene trovato su una cellula tumorale o altra cellula malata.

[0052] “Cellule T” o “linfociti T” come usato nella presente possono provenire da qualsiasi specie di mammifero, preferibilmente primati, incluse scimmie, cani ed esseri umani. In alcuni casi, le cellule T sono allogeniche (della stessa specie ma differente

donatore) come soggetto ricevente; in alcuni casi i linfociti T sono autologhi (il donatore e il ricevente coincidono); in alcuni casi i linfociti T sono singenici (il donatore e il ricevente sono differenti ma sono gemelli identici).

Modalità della descrizione

[0053] Sono descritti acidi nucleici recettori chimerici e vettori e cellule ospite che includono tali acidi nucleici. L'acido nucleico di recettore chimerico comprende una serie di componenti modulari che possono essere asportati e sostituiti con altri componenti al fine di personalizzare il recettore chimerico per una specifica molecola bersaglio. Alcuni casi includono che uno dei componenti modulari è il componente distanziatore. È stato sorprendentemente riscontrato che la lunghezza della regione distanziatrice che si ipotizza non abbia capacità di segnalazione influisce sull'efficacia in vivo delle cellule T modificate per esprimere il recettore chimerico e deve essere personalizzata per singole molecole bersaglio per una maggiore attività terapeutica.

[0054] In un caso, sono descritti metodi e costrutti di acido nucleico per progettare un recettore chimerico che ha migliorato il riconoscimento del tumore,

aumentato la proliferazione delle cellule T e/o la produzione di citochine in risposta al ligando rispetto a un recettore chimerico di riferimento. In alcuni casi, è descritta una libreria di acidi nucleici, in cui ogni acido nucleico codifica una regione distanziatrice che differisce dalle altre in sequenza e lunghezza. Ciascuno degli acidi nucleici può quindi essere usato per formare un costrutto di acido nucleico di recettore chimerico che può essere testato in vivo (in un modello animale) e/o in vitro in modo che possa essere selezionato un distanziatore che fornisca un migliore riconoscimento del tumore, aumento della proliferazione di cellule T e/o produzione di citochine in risposta al ligando.

[0055] In alcuni casi, un acido nucleico di recettore chimerico comprende un polinucleotide codificante un dominio legante il ligando, in cui il ligando è un antigene o una molecola specifica per tumore o virale, un polinucleotide codificante un distanziatore polipeptidico personalizzato, in cui il distanziatore fornisce una maggiore proliferazione delle cellule T; un polinucleotide codificante un dominio transmembrana; e un polinucleotide codificante uno o più domini di segnalazione intracellulari. In alcuni casi, viene

impiegato un distanziatore lungo se l’epitopo della molecola bersaglio è prossimale alla membrana sulla cellula bersaglio e viene impiegato un distanziatore corto se l’epitopo della molecola bersaglio è distale alla membrana sulla cellula bersaglio.

[0056] La progettazione di un recettore chimerico può essere personalizzata a seconda del tipo di tumore o virus, dell’antigene o della molecola bersaglio presente sul tumore, dell’affinità dell’anticorpo per la molecola bersaglio, della flessibilità necessaria per il dominio legante l’antigene e/o il dominio di segnalazione intracellulare. In alcuni casi, un certo numero di costrutti di recettore chimerico viene testato in vitro e in modelli in vivo per determinare la capacità delle cellule T modificate con il recettore di uccidere le cellule tumorali in topi immunodeficienti e di proliferare e persistere dopo il trasferimento adottivo. In alcuni casi, è selezionato un recettore chimerico che fornisce la capacità ad almeno il 30% delle cellule di proliferare per almeno due generazioni in vitro e/o entro 72 ore dall’introduzione in vivo. In alcuni casi, non è selezionato un recettore chimerico che ha come risultato che più del 50% delle cellule subiscono morte

cellulare indotta da attivazione (AICD, Activation Induced Cell Death) entro 72 ore in vivo in topi immunodeficienti e non riesce a eradicare le cellule tumorali.

[0057] A seconda che la molecola bersaglio sia presente o meno sulle cellule tumorali di un soggetto, il recettore chimerico include un dominio legante il ligando che si lega specificamente a tale molecola bersaglio. In alcuni casi, le cellule tumorali di un soggetto sono caratterizzate per le molecole tumorali della superficie cellulare. La molecola bersaglio può essere selezionata in base a una determinazione della sua presenza sulle cellule tumorali di un particolare soggetto. In alcuni casi, è selezionata una molecola bersaglio che è una molecola di superficie cellulare che si trova prevalentemente su cellule tumorali e non si trova su tessuti normali in misura sostanziale. In alcuni casi, è selezionato un anticorpo per legare un epitopo sulla molecola della superficie cellulare bersagliata. In alcuni casi, l'epitopo è caratterizzato rispetto alla sua vicinanza alla membrana cellulare. Un epitopo è caratterizzato come prossimale alla membrana quando è previsto o noto dall'analisi strutturale risiedere più vicino alla membrana cellulare bersaglio

rispetto a epitopi alternativi che sono previsti o noti dall'analisi strutturale risiedere a una distanza maggiore dalla membrana cellulare bersaglio. In alcuni casi, l'affinità dell'anticorpo da cui è costruito scFV viene confrontata mediante saggi di legame e gli anticorpi con differenti affinità vengono esaminati in formati di recettori chimerici espressi nelle cellule T per determinare quale affinità conferisce un riconoscimento ottimale del tumore, in base alla citotossicità superiore delle cellule bersaglio e/o produzione e proliferazione di citochine di cellule T.

[0058] Inoltre, la regione distanziatrice del recettore chimerico può essere variata per ottimizzare il riconoscimento di cellule T del ligando sulla cellula bersaglio. In alcuni casi, quando un anticorpo si lega a un epitopo sulla cellula bersaglio che è molto prossimale alla membrana, è selezionato un distanziatore più lungo di circa 15 amminoacidi. Per esempio, in alcuni casi, se l'epitopo o la relativa porzione sull'antigene bersaglio si trova nei primi 100 amminoacidi della sequenza lineare del dominio extracellulare adiacente al dominio transmembrana, può essere selezionata una regione distanziatrice lunga. In alcuni casi, quando un anticorpo si lega a un epitopo

sulla cellula bersaglio che è distale alla membrana, è selezionato un distanziatore che è di circa 119 o 15 amminoacidi o meno. Per esempio, in alcuni casi, quando l'epitopo o una relativa porzione si trova nei 150 amminoacidi della sequenza lineare del dominio extracellulare dal terminale, può essere usato un distanziatore corto o indeterminato. In alcuni casi, un distanziatore comprende una sequenza amminoacidica X_1PPX_2P.

[0059] Una varietà di combinazioni di dominio di segnalazione intracellulare primario e costimolatorio può essere impiegata per aumentare l'efficacia in vivo del recettore chimerico. In alcuni casi, differenti costrutti di recettore chimerico possono essere testati in un modello animale in vivo per determinare l'efficacia per l'uccisione del tumore. In alcuni casi, un dominio di segnalazione intracellulare costimolatorio è selezionato dal gruppo costituito da CD28 e sue versioni modificate, 4-1BB e sue versioni modificate e relative combinazioni. Possono essere incorporati altri domini di costimolazione, come OX40.

[0060] Le cellule T memoria centrali CD8+ hanno una programmazione intrinseca che consente loro di persistere per lunghi periodi dopo la somministrazione,

il che le rende un sottoinsieme preferito di cellule T CD8+ per l'immunoterapia. In alcuni casi, le cellule T citotossiche modificate con recettore chimerico specifico CD19 preparate da cellule T memoria centrali CD8+ soggette a purificazione per sorting (suddivisione) vengono somministrate in presenza o assenza di cellule T modificate con recettore chimerico specifico CD4+ CD19. In alcuni casi, le cellule T CD4+ specifiche per tumore esercitano una reattività anti-tumorale e forniscono aiuto alle cellule T CD8+ specifiche per tumore in vitro e in vivo. In un caso specifico, cellule T CD4+ specifiche per tumore o cellule T $CD4^{+}$ selezionate dal sottoinsieme naïve o memoria centrale vengono usate singolarmente o in combinazione con T^{CM} $CD8_{+}$.

Acidi nucleici, vettori e polipeptidi

[0061] È descritto un acido nucleico di recettore chimerico utile per trasformare o trasdurre i linfociti per uso nell'immunoterapia adottiva. In alcuni casi, l'acido nucleico contiene un numero di componenti modulari che forniscono una facile sostituzione di elementi dell'acido nucleico. Sebbene non destinato a limitare l'ambito della descrizione, si ritiene che il recettore chimerico per ciascun antigene tumorale sia

preferibilmente personalizzato in termini di componenti al fine di fornire efficacia in vivo ed espressione efficiente in cellule di mammifero. Per esempio, in un caso specifico, per l'efficacia di un recettore chimerico comprendente un scFV che si lega a un epitopo ROR1 situato nel dominio Ig/Frizzled distale alla membrana, viene impiegato un distanziatore che è di circa 15 amminoacidi o meno. In un altro caso specifico, per l'efficacia di un recettore chimerico comprendente uno scFV che si lega a un epitopo ROR1 situato nel dominio Kringle prossimale alla membrana, viene impiegato un distanziatore più lungo di 15 amminoacidi. In un altro caso, per l'efficacia di un recettore chimerico comprendente un scFV che si lega a CD19, viene impiegato un distanziatore di 15 amminoacidi o meno.

[0062] In alcuni casi, un acido nucleico di recettore chimerico isolato comprende un polinucleotide codificante un dominio legante il ligando, in cui la molecola bersaglio è un antigene specifico per tumore, un polinucleotide codificante un distanziatore polipeptidico in cui il distanziatore polipeptidico è di circa 229 amminoacidi o meno; un polinucleotide codificante un dominio transmembrana; e un

polinucleotide codificante un dominio di segnalazione intracellulare. In alcuni casi, un vettore di espressione comprende un acido nucleico chimerico come descritto nella presente. In questo contesto sono inclusi anche polipeptidi codificati da tutti o da una parte degli acidi nucleici di recettore chimerico.

Dominio legante il ligando

[0063] In alcuni casi, l'acido nucleico di recettore chimerico comprende un polinucleotide codificante un dominio legante il ligando. In alcuni casi, il dominio legante il ligando si lega specificamente a un tumore o a un antigene virale specifico. In alcuni casi, il dominio legante il ligando è un anticorpo o un relativo frammento. Una sequenza di acido nucleico codificante un anticorpo o un frammento di anticorpo può essere facilmente determinata. In un caso specifico, il polinucleotide codifica una singola catena Fv che lega specificamente CD19. In altri casi specifici, il polinucleotide codifica una singola catena Fv che lega specificamente ROR1. Le sequenze di questi anticorpi sono note o possono essere facilmente determinate da coloro che sono esperti nel ramo.

[0064] Gli antigeni tumorali sono proteine prodotte dalle cellule tumorali che provocano una risposta

immunitaria. La selezione del dominio legante il ligando dipenderà dal tipo di cancro da trattare e potrebbe colpire antigeni tumorali o altre molecole di superficie delle cellule tumorali. Un campione di tumore di un soggetto può essere caratterizzato per la presenza di determinati biomarcatori o marcatori di superficie cellulare. Per esempio, le cellule di cancro mammario di un soggetto possono essere positive o negative a ciascuno dei recettori Her2Neu, degli estrogeni e/o del progesterone. È selezionato un antigene tumorale o una molecola di superficie cellulare che si trova sulle cellule tumorali del singolo soggetto. Gli antigeni tumorali e le molecole di superficie cellulare sono ben noti nel ramo e includono, per esempio, antigene carcinoembrionario (CEA), antigene specifico per la prostata, PSMA, Her2/neu, recettore degli estrogeni, recettore del progesterone, efrinaB2, CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, mesotelina, c-Met, GD-2 e MAGE A3 TCR. In alcuni casi, una molecola bersaglio è una molecola della superficie cellulare che si trova sulle cellule tumorali e non si trova sostanzialmente sui tessuti normali, o limitata nella sua espressione a tessuti normali non vitali.

[0065] Altre molecole bersaglio includono in via non limitativa gli antigeni derivati da patogeni infettivi come l'HIV (virus dell'immunodeficienza umana), l'HBV (virus dell'epatite B), l'HPV (virus del papilloma umano) e il virus dell'epatite C.

[0066] In un caso, la molecola bersaglio sul tumore comprende uno o più epitopi associati a un tumore maligno. I tumori maligni esprimono un numero di proteine che possono fungere da antigeni bersaglio per il riconoscimento mediato dal recettore di cellule T o dal recettore chimerico. Altre molecole bersaglio appartengono al gruppo delle molecole legate alla trasformazione cellulare come l'oncogene HER-2/Neu/ErbB2. In alcuni casi, l'antigene tumorale è selettivamente espresso o sovraespresso sulle cellule tumorali rispetto alle cellule di controllo dello stesso tipo di tessuto. In altri casi, l'antigene tumorale è un polipeptide della superficie cellulare.

[0067] Una volta identificata una molecola di superficie della cellula tumorale che potrebbe essere bersagliata con un recettore chimerico, è selezionato e caratterizzato un epitopo della molecola bersaglio. In alcuni casi, è selezionato un epitopo prossimale alla membrana delle cellule tumorali. In altri casi, è

selezionato un epitopo distale alla membrana delle cellule tumorali. Un epitopo è caratterizzato come prossimale alla membrana quando è previsto o noto dall'analisi strutturale risiedere più vicino alla membrana cellulare bersaglio rispetto a epitopi alternativi che sono previsti o noti dall'analisi strutturale risiedere a una distanza maggiore dalla membrana cellulare bersaglio.

[0068] Gli anticorpi che si legano in modo specifico a una molecola di superficie della cellula tumorale possono essere preparati usando metodi per ottenere anticorpi monoclonali, metodi di esposizione su fago, metodi per generare anticorpi umani o umanizzati o metodi che usano un animale o una pianta transgenica progettati per produrre anticorpi umani. Sono disponibili librerie di esposizione su fago di anticorpi parzialmente o completamente sintetici che possono essere sottoposti a screening per un anticorpo o un relativo frammento che può legarsi alla molecola bersaglio. Sono disponibili anche librerie di esposizione su fago di anticorpi umani. In alcuni casi, gli anticorpi si legano in modo specifico a una molecola di superficie della cellula tumorale e non reagiscono in modo crociato con componenti aspecifici

come l'albumina sierica bovina o altri antigeni non correlati. Una volta identificata, la sequenza amminoacidica o la sequenza polinucleotidica codificante l'anticorpo può essere isolata e/o determinata.

[0069] Gli anticorpi o i frammenti leganti l'antigene includono tutti o una parte di anticorpi policlonali, un anticorpo monoclonale, un anticorpo umano, un anticorpo umanizzato, un anticorpo sintetico, un anticorpo chimerico, un anticorpo bispecifico, un minibody e un anticorpo lineare. "Frammenti di anticorpo" comprendono una porzione di un anticorpo intatto, preferibilmente la regione legante l'antigene o variabile dell'anticorpo intatto e possono essere prontamente preparati. Esempi di frammenti di anticorpi includono i frammenti Fab, Fab', $F(ab')_2$ e Fv; diabody; anticorpi lineari; molecole di anticorpi a catena singola; e anticorpi multispecifici formati da frammenti di anticorpo.

[0070] In alcuni casi, è possibile isolare e caratterizzare un certo numero di differenti anticorpi che si legano a particolari molecole di superficie delle cellule tumorali. In alcuni casi, gli anticorpi sono caratterizzati in base alla specificità

dell'epitopo della molecola bersaglio. Inoltre, in alcuni casi, gli anticorpi che si legano allo stesso epitopo possono essere selezionati in base all'affinità dell'anticorpo per quell'epitopo. In alcuni casi, un anticorpo ha un'affinità di almeno 1 mM e preferibilmente <50 nM. In alcuni casi, è selezionato un anticorpo che ha una maggiore affinità per l'epitopo rispetto ad altri anticorpi. Per esempio, è selezionato un anticorpo che ha almeno 2 volte, almeno 5 volte, almeno 10 volte, almeno 20 volte, almeno 30 volte, almeno 40 volte o almeno 50 volte alcuni casi maggiore affinità rispetto a un anticorpo di riferimento che si lega allo stesso epitopo.

[0071] In alcuni casi, le molecole bersaglio sono selezionate dal gruppo consistente di CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, mesotelina, Her2, c-Met, PSMA, GD-2, MAGE A3 TCR e relative combinazioni.

[0072] In casi specifici, l'antigene bersaglio è CD19. Un certo numero di anticorpi specifici per CD19 sono noti agli esperti del ramo e possono essere facilmente caratterizzati per sequenza, legame epitopico e affinità. In un caso specifico, il costrutto di recettore chimerico include una sequenza scFV dall'anticorpo FMC63. In altri casi, scFV è uno ScFv

umano o umanizzato comprendente una catena leggera variabile comprendente una sequenza CDRL1 di RASQDISKYLN, una sequenza CDRL2 di SRLHSGV e una sequenza CDRL3 di GNTLPYTFG. In altri casi, lo scFV è uno ScFv umano o umanizzato comprendente una catena pesante variabile comprendente la sequenza CDRH1 di DYGVS, la sequenza CDRH2 di VIWGSETTYYNSALKS e una sequenza CDRH3 di YAMDYWG. Alcuni casi contemplano anche regioni variabili che hanno almeno il 90% di identità di sequenza amminoacidica rispetto a quella di scFv per FMC63 e che hanno almeno la stessa affinità per CD19. In alcuni casi, il recettore chimerico ha un distanziatore corto o intermedio di 119 amminoacidi o meno, o 12 amminoacidi o meno. In un caso specifico, il distanziatore è di 12 amminoacidi o meno e ha una sequenza di SEQ ID NO:4.

[0073] In alcuni casi, le regioni CDR si trovano all'interno delle regioni degli anticorpi numerate da Kabat come segue: per la catena leggera; amminoacidi CDRL1 24–34; amminoacidi CDRL2 50–56; CDRL3 in corrispondenza degli amminoacidi 89–97; per la catena pesante in corrispondenza di CDRH1 in corrispondenza degli amminoacidi 31–35; CDRH2 in corrispondenza degli amminoacidi 50–65; e per CDRH3 in corrispondenza degli

amminoacidi 95–102. Le regioni CDR negli anticorpi possono essere facilmente determinate.

[0074] In casi specifici, l'antigene bersaglio è ROR1. Un certo numero di anticorpi specifici per ROR1 è noto agli esperti del ramo e può essere facilmente caratterizzato per sequenza, legame epitopico e affinità. In un caso specifico, il costrutto di recettore chimerico include una sequenza scFV dall'anticorpo R12. In altri casi, scFV è uno ScFv umano o umanizzato comprendente una catena leggera variabile comprendente una sequenza CDRL1 di ASGFDFSAYYM, una sequenza CDRL2 di TIYPSSG e una sequenza CDRL3 di ADRATYFCA. In altri casi, lo scFV è uno ScFv umano o umanizzato comprendente una catena pesante variabile che comprende la sequenza CDRH1 di DTIDWY, la sequenza CDRH2 di VQSDGSYTKRPGVPDR e una sequenza CDRH3 di YIGGYVFG. Alcuni casi contemplano anche regioni variabili che hanno almeno il 90% di identità di sequenza amminoacidica rispetto a quella di scFv per R12 e che hanno almeno la stessa affinità per ROR1. In alcuni casi, il recettore chimerico ha un distanziatore corto o intermedio di 119 amminoacidi o meno, o 12 amminoacidi o meno. In un caso specifico, il distanziatore è di 12 amminoacidi o meno e ha una

sequenza di SEQ ID NO:4.

[0075] In casi specifici, l'antigene bersaglio è ROR1. Un certo numero di anticorpi specifici per ROR1 è noto agli esperti del ramo e può essere facilmente caratterizzato per sequenza, legame epitopico e affinità. In un caso specifico, il costrutto di recettore chimerico include una sequenza scFV dall'anticorpo R11. In altri casi, scFV è uno ScFv umano o umanizzato comprendente una catena leggera variabile comprendente una sequenza CDRL1 di SGSDINDYPIS, una sequenza CDRL2 di INSGGST e una sequenza CDRL3 di YFCARGYS. In altri casi, scFV è uno ScFv umano o umanizzato comprendente una catena pesante variabile comprendente una sequenza CDRH1 di SNLAW, una sequenza CDRH2 di RASNLASGVPSRFSGS e una sequenza CDRH3 di NVSYRTSF. Alcuni casi contemplano anche regioni variabili che hanno almeno il 90% di identità di sequenza amminoacidica a quella di scFv per R11 e che hanno almeno la stessa affinità per ROR1. In alcuni casi, il recettore chimerico ha un distanziatore lungo di 229 amminoacidi o meno. In un caso specifico, il distanziatore è di 229 amminoacidi e ha una sequenza di SEQ ID NO:50.

[0076] In casi specifici, l'antigene bersaglio è Her2.

Un certo numero di anticorpi specifici per Her2 sono noti agli esperti del ramo e possono essere facilmente caratterizzati per sequenza, legame epitopico e affinità. In un caso specifico, il costrutto di recettore chimerico include una sequenza scFV dall'anticorpo Herceptin. In altri casi, lo scFV è uno ScFv umano o umanizzato comprendente una catena leggera variabile comprendente una sequenza CDRL1, una sequenza CDRL2 e una sequenza CDRL3 dell'anticorpo Herceptin. In altri casi, lo scFV è uno ScFv umano o umanizzato comprendente una catena pesante variabile comprendente la sequenza CDRH1, CDRH2 e una sequenza CDRH3 di Herceptin. Le sequenze CDR possono essere facilmente determinate dalla sequenza amminoacidica di Herceptin. Alcuni casi contemplano anche regioni variabili che hanno almeno il 90% di identità di sequenza amminoacidica rispetto a quella di scFv per Herceptin e che hanno almeno la stessa affinità per Her2. In alcuni casi, il recettore chimerico ha un distanziatore lungo di 229 amminoacidi o meno. In un caso specifico, il distanziatore è di 229 amminoacidi e ha una sequenza di SEQ ID NO:50.

[0077] In alcuni casi, un polinucleotide codificante un dominio legante il ligando è operativamente collegato a

un polinucleotide codificante una regione distanziatrice. In alcuni casi, il polinucleotide codificante un dominio legante il ligando può anche avere uno o più siti dell'enzima di restrizione in corrispondenza delle estremità 5' e/o 3' della sequenza codificante al fine di fornire una facile escissione e sostituzione del polinucleotide con un altro polinucleotide codificante un dominio legante il ligando codificante un antigene differente o che ha caratteristiche di legame differenti. Per esempio, un sito di restrizione, NheI, è codificato a monte della sequenza leader; e un 3' RsrII situato all'interno della regione cerniera consente il subclonaggio di qualsiasi scFv desiderabile in un vettore di recettore chimerico. In alcuni casi, il polinucleotide è ottimizzato per codone per l'espressione nelle cellule di mammifero.

[0078] In alcuni casi, il polinucleotide codificante un dominio legante il ligando è operativamente collegato a un peptide segnale. In alcuni casi il peptide segnale è un peptide segnale per il fattore stimolante le colonie di granulociti. Possono essere usati polinucleotidi che codificano altri peptidi di segnale come CD8 alfa.

[0079] In alcuni casi, il polinucleotide codificante un

dominio legante il ligando è operativamente collegato a un promotore. È selezionato un promotore che fornisce l'espressione del recettore chimerico di antigeni in una cellula di mammifero. In un caso specifico il promotore è il promotore del fattore di crescita dell'allungamento (EF-1). Un altro esempio di un promotore adatto è la sequenza di promotore immediato di citomegalovirus (CMV) precoce. Tuttavia, possono essere usate anche altre sequenze di promotore costitutivo, inclusi, in via non limitativa, promotore precoce di virus simiano 40 (SV 40), virus del tumore mammario murino (MMTV), promotore di ripetizione terminale lunga (LTR) del virus dell'immunodeficienza umana (HIV), promotore MuMoLV, un promotore di virus della leucemia aviaria, un promotore precoce immediato del virus Epstein-Barr, un promotore del virus del sarcoma di Rous, nonché promotori di geni umani come, in via non limitativa, il promotore di actina, il promotore di miosina, il promotore di emoglobina, e il promotore di creatina chinasi. Sono anche contemplati promotori inducibili. Esempi di promotori inducibili includono, in via non limitativa, un promotore della metallotionina, un promotore di glucocorticoide, un promotore di progesterone e un promotore di

tetraciclina.

[0080] Un caso specifico di un polinucleotide codificante un dominio legante il ligando è mostrato nella Tabella 1 come scFv da un anticorpo che si lega specificamente a CD19, come FMC63. Un polinucleotide codificante un linker flessibile che include gli amminoacidi GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO:36) separa le catene VH e VL nello scFV. La sequenza amminoacidica di scFv incluso il linker è mostrata nella Tabella 2. (SEQ ID NO:1 1) Sono noti altri anticorpi anti-CD19 come SJ25C1 e HD37. (SJ25C1: Bejcek et al. Cancer Res 2005, PMID 7538901; HD37: Pezutto et al. JI 1987, PMID 2437199).

Distanziatore

[0081] In alcuni casi, l'acido nucleico di recettore chimerico comprende un polinucleotide codificante una regione distanziatrice. È stato sorprendentemente riscontrato che la lunghezza della regione distanziatrice che si ipotizza non abbia capacità di segnalazione influisce sull'efficacia in vivo delle cellule T modificate per esprimere il recettore chimerico e deve essere personalizzata per singole molecole bersaglio per un riconoscimento ottimale di un tumore o una cellula bersaglio. In alcuni casi, l'acido

nucleico di recettore chimerico comprende un polinucleotide codificante una regione distanziatrice personalizzabile selezionata da una libreria di polinucleotidi codificante regioni di distanziatori. In alcuni casi, una lunghezza del distanziatore è selezionata in base alla posizione dell'epitopo, all'affinità dell'anticorpo per l'epitopo e/o alla capacità delle cellule T esprimenti il recettore chimerico di proliferare in vitro e/o in vivo in risposta al riconoscimento dell'antigene.

[0082] Tipicamente una regione distanziatrice si trova tra il dominio legante il ligando e il dominio transmembrana del recettore chimerico. In alcuni casi, una regione distanziatrice fornisce flessibilità del dominio legante il ligando, consente alti livelli di espressione nei linfociti. Un recettore chimerico specifico per CD19 avente un dominio distanziatore di circa 229 amminoacidi aveva una minore attività anti-tumorale rispetto a un recettore chimerico specifico per CD19 con una breve regione distanziatrice composta soltanto dalla cerniera IgG4 modificata. Altri recettori chimerici, come quelli costruiti dagli scFv R12 o 2A2 richiedono anch'essi un distanziatore corto per l'attivazione ottimale delle funzioni effettrici

delle cellule T, mentre un recettore chimerico costruito con R11 ROR1 scFv richiede un dominio distanziatore lungo di circa 229 amminoacidi per il riconoscimento tumorale.

[0083] In alcuni casi, una regione distanziatrice ha almeno da circa 10 a 229 amminoacidi, da circa 10 a 200 amminoacidi, da circa 10 a 175 amminoacidi, da circa 10 a 150 amminoacidi, da circa 10 a 125 amminoacidi, da circa 10 a 100 amminoacidi, da circa 10 a 75 amminoacidi, da circa 10 a 50 amminoacidi, da circa 10 a 40 amminoacidi, da circa 10 a 30 amminoacidi, da circa 10 a 20 amminoacidi o da circa 10 a 15 amminoacidi, e incluso qualsiasi numero intero tra i punti finali di uno qualsiasi degli intervalli elencati. In alcuni casi, una regione distanziatrice ha circa 12 amminoacidi o meno, circa 119 amminoacidi o meno, o circa 229 amminoacidi o meno.

[0084] In alcuni casi, la regione distanziatrice è derivata da una regione cerniera di una molecola simile all'immunoglobulina. In alcuni casi, una regione distanziatrice comprende tutta o una parte della regione cerniera da una IgG1 umana, IgG2 umana, IgG3 umana o IgG4 umana, e può contenere una o più sostituzioni amminoacidiche. Sequenze esemplificative

delle regioni cerniera sono fornite nella Tabella 8. In alcuni casi, una porzione della regione cerniera include gli amminoacidi cerniera superiore trovati tra la catena pesante variabile e il nucleo, e gli amminoacidi cerniera del nucleo includendo una regione poliprolina. Tipicamente, la regione cerniera superiore ha da 3 a 10 amminoacidi. In alcuni casi, la regione distanziatrice comprende una sequenza amminoacidica di X_1PPX_2P (SEQ ID NO:1). In alcuni casi, X_1 è una cisteina, glicina o arginina e X2 è una cisteina o una treonina.

[0085] In alcuni casi, le sequenze della regione cerniera possono essere modificate in uno o più amminoacidi al fine di evitare interazioni strutturali indesiderabili come la dimerizzazione. In un caso specifico, la regione distanziatrice comprende una porzione di una regione cerniera umana modificata da IgG4, per esempio, come mostrato nella Tabella 2 o nella Tabella 8 (SEQ ID NO:21). Un rappresentante di un polinucleotide codificante una porzione di una regione di cerniera IgG4 modificata è fornito nella Tabella 1. (SEQ ID NO:4) In alcuni casi, una regione cerniera può avere almeno circa il 90%, 92%, 95% o 100% di identità di sequenza rispetto a una sequenza amminoacidica della

regione cerniera identificata nella Tabella 2 o nella Tabella 8. In un caso specifico, una porzione di una regione cerniera umana da IgG4 ha una sostituzione amminoacidica negli amminoacidi centrali da CPSP a CPPC.

[0086] In alcuni casi, tutta o una parte della regione cerniera è combinata con uno o più domini di una regione costante di un'immunoglobulina. Per esempio, una porzione di una regione cerniera può essere combinata con tutto o una porzione di un dominio CH2 o CH3 o una relativa variante. In alcuni casi, la regione distanziatrice non include la sequenza di regione cerniera di amminoacidi 47-48 da CD8alfa o la regione distanziatrice costituita da una porzione extracellulare della molecola CD28.

[0087] In alcuni casi, una regione distanziatrice corta ha circa 12 amminoacidi o meno e comprende tutta o una parte di una sequenza di regione cerniera IgG4 o una relativa variante, una regione distanziatrice intermedia ha circa 119 amminoacidi o meno e comprende tutto o una porzione di un sequenza di regione cerniera IgG4 e una regione CH3 o una relativa variante, e un distanziatore lungo ha circa 229 amminoacidi o meno e comprende tutta o una parte di una sequenza di regione

cerniera IgG4, una regione CH2 e una regione CH3 o una relativa variante.

[0088] Un polinucleotide codificante una regione distanziatrice può essere facilmente preparato mediante metodi sintetici o ricombinanti dalla sequenza amminoacidica. In alcuni casi, un polinucleotide codificante una regione distanziatrice è operativamente collegata a un polinucleotide codificante una regione transmembrana. In alcuni casi, il polinucleotide codificante la regione distanziatrice può anche avere uno o più siti enzimatici di restrizione in corrispondenza delle estremità 5’ e/o 3’ della sequenza codificante al fine di fornire una facile escissione e sostituzione del polinucleotide con un altro polinucleotide codificante una regione distanziatrice differente. In alcuni casi, il polinucleotide codificante la regione distanziatrice è ottimizzato per codone per l’espressione nelle cellule di mammifero.

[0089] In alcuni casi, è descritta una libreria di polinucleotidi, ciascuna codificante una regione distanziatrice differente. In un caso, la regione distanziatrice è selezionata dal gruppo consistente di una sequenza di regione cerniera da IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 o parte di essa, una sequenza di regione cerniera

da IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 in combinazione con tutto o un porzione di una regione CH2 o una relativa variante, una sequenza di regione cerniera da IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 in combinazione con tutta o una parte di una regione CH3 o una relativa variante, e una sequenza di regione cerniera da IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 in combinazione con tutta o una parte di una regione CH2 o una relativa variante, e una regione CH3 o una relativa variante. In alcuni casi, una breve regione distanziatrice è una sequenza cerniera IgG4 modificata (SEQ ID NO:4) avente 12 amminoacidi o meno, una sequenza intermedia è una sequenza cerniera IgG4 con una sequenza CH3 avente 119 amminoacidi o meno (SEQ ID NO:49); o una sequenza cerniera IgG4 con una regione CH2 e CH3 avente 229 amminoacidi o meno (SEQ ID NO:50).

[0090] In alcuni casi, nella presente è descritto un metodo per selezionare una regione distanziatrice per un recettore chimerico. Sorprendentemente alcuni costrutti di recettore chimerico, sebbene efficaci per attivare le cellule T e dirigere la loro uccisione di cellule tumorali in vitro, non erano efficaci in vivo. Inoltre, il profilo degli effetti collaterali dei linfociti T modificati con recettore chimerico può essere tale da comportare un maggior numero di cellule

che subiscono morte cellulare indotta dall'attivazione o causare un aumento delle citochine in vivo. In alcuni casi, un metodo comprende fornire una pluralità di acidi nucleici di recettore chimerico, in cui gli acidi nucleici di recettore chimerico differiscono soltanto nella regione distanziatrice; introdurre ciascuno degli acidi nucleici di recettore chimerico in una popolazione di linfociti T separata; espandere ciascuna popolazione di linfociti separata in vitro e introdurre ciascuna popolazione di linfociti in un animale portatore di un tumore per determinare l'efficacia anti-tumorale di ciascuno dei recettori chimerici quando espresso nelle cellule T, e selezionare un recettore chimerico che fornisce efficacia anti-tumorale come rispetto a ciascuna delle altre popolazioni linfocitarie separate modificate con ciascuno degli altri recettori chimerici.

[0091] Sono noti modelli animali di differenti tumori. L'efficacia anti-tumorale può essere misurata identificando una diminuzione del volume tumorale, determinando la morte dell'animale, la persistenza dei linfociti T geneticamente modificati in vivo, l'attivazione dei linfociti T geneticamente modificati (per esempio, rilevando un aumento dell'espressione di

CD25 e/CD69) e/o la proliferazione di cellule T geneticamente modificate in vivo. In un caso, è selezionato un recettore chimerico che fornisce la migliore efficacia anti-tumorale in vivo determinata mediante uno o più di questi parametri. La mancanza di efficacia anti-tumorale può essere determinata dalla mancanza di persistenza dei linfociti geneticamente modificati in vivo, dalla morte degli animali, da un aumento dell'apoptosi misurata da un aumento dell'induzione della caspasi -3 e/o da una diminuzione della proliferazione dei linfociti geneticamente modificati.

[0092] In altri casi, un metodo per selezionare un distanziatore comprende selezionare un epitopo di una molecola bersaglio e caratterizzare la posizione dell'epitopo rispetto alla membrana cellulare, selezionare una regione distanziatrice che è lunga o corta a seconda della posizione dell'epitopo rispetto alla membrana cellulare, selezionare un anticorpo o un relativo frammento che abbia un'affinità per l'epitopo che è maggiore o minore rispetto a un anticorpo di riferimento e determinare se il costrutto di recettore chimerico fornisce una maggiore proliferazione delle cellule T o produzione di citochine in vitro e/o in

vivo.

[0093] In alcuni casi, se l'epitopo bersaglio o una relativa porzione si trova prossimale alla membrana, si trova nei primi 100 amminoacidi della sequenza lineare del dominio extracellulare adiacente al dominio transmembrana. Se l'epitopo si trova prossimale alla membrana, è selezionato un distanziatore lungo (per esempio 229 amminoacidi o inferiore e maggiore di 119 amminoacidi). In alcuni casi, se l'epitopo bersaglio si trova distale alla membrana, si trova nei primi 150 amminoacidi della sequenza lineare del terminale del dominio extracellulare. Se l'epitopo si trova distale alla membrana, è selezionato un distanziatore intermedio o corto (per esempio 119 amminoacidi o meno o 12–15 amminoacidi o meno). In alternativa, se l'epitopo è prossimale o distale alla membrana può essere determinato modellando la struttura tridimensionale o in base all'analisi della struttura cristallina,

[0094] In alcuni casi, è selezionato un recettore chimerico che fornisce almeno il 30% delle cellule che proliferano attraverso due generazioni in vitro e/o in vivo. In altri casi non è selezionato un recettore chimerico se risulta che almeno il 50% delle cellule

subiscono morte cellulare indotta dall'attivazione in 72 ore. In alcuni casi, è selezionato un distanziatore corto (per esempio 15 amminoacidi o meno) se l'epitopo è distale alla membrana. In alcuni casi, è selezionato un distanziatore lungo (per esempio 229 amminoacidi o inferiore e maggiore di 119 amminoacidi) se l'epitopo è prossimale alla membrana.

[0095] In alcuni casi, il fatto di fornire una pluralità di acidi nucleici di recettore chimerico, in cui gli acidi nucleici di recettore chimerico differiscono soltanto nella regione distanziatrice comprende fornire un costrutto di recettore chimerico comprendente un polinucleotide codificante un dominio legante il ligando, in cui il ligando è un antigene specifico per tumore, un antigene virale o qualsiasi altra molecola espressa su una popolazione di cellule bersaglio che sia adatta a mediare il riconoscimento e l'eliminazione da parte di un linfocita; un polinucleotide codificante un primo distanziatore polipeptidico avente un sito di restrizione definito in corrispondenza dell'estremità 5' e 3' della sequenza codificante il primo distanziatore polipeptidico; un polinucleotide codificante un dominio transmembrana; e un polinucleotide codificante uno o più domini di

segnalazione intracellulari.

[0096] In alcuni casi, un metodo comprende inoltre fornire uno o più polinucleotidi, ciascuno codificante una regione distanziatrice differente. In alcuni casi, le differenti regioni distanziatori sono selezionate dal gruppo consistente di una sequenza di regione cerniera da IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 o una relativa variante o parte di essa, una sequenza di regione cerniera da IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 in combinazione con tutta o una parte di una regione CH2 o una relativa variante, una sequenza di regione cerniera da IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 in combinazione con tutta o una parte di una regione CH3 o una relativa variante, e una sequenza di regione cerniera da IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4 in combinazione con tutta o una parte di una regione CH2 o una relativa variante e una regione CH3 o una relativa variante. In alcuni casi, le regioni CH2 o CH3 possono essere modificate da una o più delezioni o sostituzioni amminoacidiche al fine di fornire l'espressione nei linfociti e/o per minimizzare le interazioni con altre molecole. In alcuni casi, una porzione di una regione cerniera comprende almeno gli amminoacidi superiori e la sequenza del nucleo. In alcuni casi, una regione cerniera comprende la sequenza

X_1PPX_2P.

[0097] In alcuni casi, un metodo comprende inoltre sostituire il polinucleotide codificante la regione distanziatrice con un polinucleotide codificante una regione distanziatrice differente per formare un acido nucleico di recettore chimerico con una regione distanziatrice differente. Il metodo può essere ripetuto per formare un numero qualsiasi di acidi nucleici di recettore chimerico, ciascuno differente nella regione distanziatrice. In alcuni casi, gli acidi nucleici di recettore chimerico differiscono l'uno dall'altro soltanto nella regione distanziatrice.

Dominio transmembrana

[0098] In alcuni casi, l'acido nucleico di recettore chimerico comprende un polinucleotide codificante un dominio transmembrana. Il dominio transmembrana fornisce l'ancoraggio del recettore chimerico nella membrana.

[0099] In un caso, viene usato il dominio transmembrana che è naturalmente associato a uno dei domini nel recettore chimerico. In alcuni casi, il dominio transmembrana può essere selezionato o modificato mediante sostituzione amminoacidica per evitare il legame di tali domini ai domini transmembrana della

stessa o differenti proteine di membrana di superficie per minimizzare le interazioni con altri elementi del complesso recettore.

[0100] Il dominio transmembrana può essere derivato da una sorgente naturale o sintetica. Laddove la sorgente è naturale, il dominio può essere derivato da qualsiasi proteina legata alla membrana o transmembrana. Le regioni transmembrana comprendono almeno la regione o le regioni transmembrana della catena alfa, beta o zeta del recettore di cellule T, CD28, CD3, CD45, CD4, CD8, CD9, CD16, CD22; CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 e CD154. In un caso specifico, il dominio transmembrana comprende la sequenza amminoacidica del dominio transmembrana CD28 come mostrato nella Tabella 2. Una sequenza polinucleotidica rappresentativa codificante il dominio transmembrana CD28 è mostrata nella Tabella 1 (SEQ ID NO:5).

[0101] Un dominio transmembrana può essere sintetico o una variante di un dominio transmembrana presente in natura. In alcuni casi, i domini transmembrana sintetici o varianti comprendono residui prevalentemente idrofobici come leucina e valina. In alcuni casi, un dominio transmembrana può avere almeno circa l'80%, l'85%, il 90%, il 95% o il 100% di

identità di sequenza amminoacidica rispetto a un dominio transmembrana come mostrato nella Tabella 2 o nella Tabella 6. I domini transmembrana varianti hanno preferibilmente un punteggio idrofobo di almeno 50 come calcolato da Kyte Doolittle.

[0102] Un polinucleotide codificante un dominio transmembrana può essere facilmente preparato mediante metodi sintetici o ricombinanti. In alcuni casi, un polinucleotide codificante un dominio transmembrana è operativamente collegato a un polinucleotide codificante una regione di segnalazione intracellulare. In alcuni casi, il polinucleotide codificante un dominio transmembrana può anche avere uno o più siti enzimatici di restrizione in corrispondenza delle estremità 5’ e/o 3’ della sequenza codificante al fine di fornire una facile escissione e sostituzione del polinucleotide codificante un dominio transmembrana con un altro polinucleotide codificante un differente dominio transmembrana. In alcuni casi, il polinucleotide codificante un dominio transmembrana è ottimizzato per codone per l’espressione nelle cellule di mammifero.

Dominio di segnalazione intracellulare

[0103] In alcuni casi, l’acido nucleico di recettore

chimerico comprende un polinucleotide codificante un dominio di segnalazione intracellulare. Il dominio di segnalazione intracellulare fornisce l'attivazione di una funzione della cellula trasdotta che esprime il recettore chimerico in seguito al legame con il ligando espresso sulle cellule tumorali. In alcuni casi, il dominio di segnalazione intracellulare contiene uno o più domini di segnalazione intracellulare. In alcuni casi, il dominio di segnalazione intracellulare è una porzione e/o una variante di un dominio di segnalazione intracellulare che fornisce l'attivazione di almeno una funzione della cellula trasdotta.

[0104] Esempi di domini di segnalazione intracellulare da usare in un recettore chimerico come descritto includono le sequenze citoplasmatiche della catena CD3 zeta e/o corecettori che agiscono insieme per avviare la trasduzione del segnale dopo l'impegno del recettore chimerico, nonché qualsiasi derivato o variante di queste sequenze e qualsiasi sequenza sintetica che abbia la stessa capacità funzionale. È possibile affermare che l'attivazione delle cellule T sia mediata da due classi distinte di sequenze di segnalazione citoplasmatica: quelle che avviano l'attivazione primaria dipendente dall'antigene e forniscono un

segnale simile al recettore di cellule T (sequenze di segnalazione citoplasmatica primaria) e quelle che agiscono in modo indipendente dall'antigene per fornire un segnale secondario o co-stimolatorio (sequenze di segnalazione citoplasmatica secondaria). Le sequenze di segnalazione citoplasmatica primarie che agiscono in modo stimolatorio possono contenere motivi di segnalazione noti come motivi di attivazione basati sulla tirosina del recettore o ITAM. Esempi di ITAM contenenti sequenze di segnalazione citoplasmatica primarie includono quelle derivate da CD3 zeta, FcR gamma, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b e CD66d. In alcuni casi, il dominio intracellulare di segnalazione primaria può avere almeno circa l'80%, l'85%, il 90% o il 95% di identità di sequenza per CD3zeta avente una sequenza fornita nella Tabella 2. In alcuni casi, varianti di CD3 zeta conservano almeno una, due, tre o tutte le regioni ITAM come mostrato nella Tabella 7.

[0105] In un caso specifico, il dominio di segnalazione intracellulare del recettore chimerico può essere progettato per comprendere il dominio di segnalazione di CD3-zeta da solo o combinato con qualsiasi altro dominio citoplasmatico desiderato. Per esempio, il

dominio di segnalazione intracellulare del recettore chimerico può comprendere una catena CD3zeta e una regione di segnalazione costimolatoria.

[0106] La regione di segnalazione costimolatoria si riferisce a una porzione del recettore chimerico comprendente il dominio intracellulare di una molecola costimolatoria. Una molecola costimolatoria è una molecola della superficie cellulare differente da un recettore dell'antigene o dai loro ligandi, necessaria per una risposta dei linfociti a un antigene. Esempi di tali molecole includono CD27, CD28, 4-1BB (CD 137), OX40, CD30, CD40, antigene-1 associato alla funzione linfocitaria (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 e un ligando che si lega specificatamente a CD83. In alcuni casi, il dominio di segnalazione costimolatorio può avere almeno circa l'80%, l'85%, il 90% o il 95% di identità di sequenza amminoacidica rispetto al dominio intracellulare di CD28 come mostrato nella Tabella 5 o 4-1BB con una sequenza fornita nella Tabella 2. In un caso, una variante del dominio intracellulare CD28 comprende una sostituzione amminoacidica nelle posizioni 186-187, in cui LL è sostituito con GG.

[0107] Le sequenze di segnalazione intracellulare del recettore chimerico possono essere collegate tra loro

in un ordine casuale o specificato. Facoltativamente, un linker oligo- o polipeptidico corto, preferibilmente tra 2 e 10 amminoacidi di lunghezza può formare il legame. In un caso, i domini di segnalazione intracellulari comprendono tutto o una parte del dominio di segnalazione di CD3-zeta o una relativa variante e tutto o una parte del dominio di segnalazione di CD28 o una relativa variante. In un altro caso, il dominio di segnalazione intracellulare comprende tutto o una porzione del dominio di segnalazione di CD3-zeta o una relativa variante e tutto o una parte del dominio di segnalazione di 4-1BB o una relativa variante. In ancora un altro caso, il dominio di segnalazione intracellulare comprende tutto o una parte del dominio di segnalazione di CD3-zeta o una relativa variante, tutto o una parte del dominio di segnalazione di CD28 o una relativa variante, e tutto o una parte del dominio di segnalazione di 4-1BB o una relativa variante. In un caso specifico, la sequenza amminoacidica del dominio di segnalazione intracellulare comprendente una variante di CD3zeta e una porzione del dominio di segnalazione intracellulare 4-1BB è fornita nella Tabella 2. Una sequenza rappresentativa di acido nucleico è fornita nella

Tabella 1 (SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:7).

[0108] In un caso, un polinucleotide codificante un dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio intracellulare 4-1BB collegato a una porzione di un dominio CD3zeta. In altri casi, un dominio intracellulare 4-1BB e un dominio intracellulare CD28 sono collegati a una porzione di un dominio CD3 zeta.

[0109] Un polinucleotide codificante un dominio di segnalazione intracellulare può essere facilmente preparato mediante metodi sintetici o ricombinanti dalla sequenza amminoacidica. In alcuni casi, il polinucleotide codificante un dominio di segnalazione intracellulare può anche avere uno o più siti enzimatici di restrizione in corrispondenza delle estremità 5' e/o 3' della sequenza codificante al fine di fornire una facile escissione e sostituzione del polinucleotide codificante un dominio di segnalazione intracellulare con un altro polinucleotide codificante un differente dominio di segnalazione intracellulare. In alcuni casi, il polinucleotide codificante un dominio di segnalazione intracellulare è ottimizzato per codone per l'espressione nelle cellule di mammifero.

Sequenze di marcatore

[0110] In alcuni casi, l'acido nucleico di recettore chimerico facoltativamente comprende inoltre una sequenza polinucleotidica codificante una sequenza di marcatore. Una sequenza di marcatore può fornire la selezione delle cellule trasdotte e l'identificazione delle cellule trasdotte. In alcuni casi, la sequenza di marcatore è operativamente collegata a una sequenza polinucleotidica codificante una sequenza linker. In alcuni casi, la sequenza linker è una sequenza linker clivabile.

[0111] È possibile impiegare numerose sequenze di marcatore differenti. Tipicamente una sequenza di marcatore ha una caratteristica funzionale che consente la selezione di cellule trasdotte e/o il rilevamento di cellule trasdotte. In alcuni casi, la sequenza di marcatore è compatibile con la trasduzione dei linfociti umani.

[0112] Il marcatore selezionabile positivo può essere un gene che, una volta introdotto nella cellula ospite, esprime un fenotipo dominante che consente la selezione positiva delle cellule che trasportano il gene. I geni di questo tipo sono noti nel ramo e includono, fra l'altro, il gene di igromicina-B fosfotransferasi (hph) che conferisce resistenza all'igromicina B, il gene di

ammino glicoside fosfotransferasi (neo o aph) da Tn5 che codifica la resistenza all'antibiotico G418, il gene di diidrofolato reduttasi (DHFR), il gene di adenosina deaminasi (ADA) e il gene di resistenza multi-farmaco (MDR).

[0113] In un caso, un acido nucleico di recettore chimerico comprende inoltre un polinucleotide codificante una sequenza di marcatore. In un caso, la sequenza di marcatore è un recettore del fattore di crescita epidermico troncato, come mostrato nella Tabella 2. Un polinucleotide esemplificativo per il recettore del fattore di crescita epidermico troncato è mostrato nella Tabella 1. (SEQ ID NO:9) In casi, il polinucleotide codificante la sequenza di marcatore è operativamente collegato a un polinucleotide codificante una sequenza linker. In un caso specifico, la sequenza linker è una sequenza linker clivabile T2A come mostrato nella Tabella 2. Una codifica di sequenza polinucleotidica esemplificativa per il linker T2A è fornita nella Tabella 1. (SEQ ID NO:8)

[0114] Un polinucleotide codificante la sequenza di marcatore può essere facilmente preparato mediante metodi sintetici o ricombinanti dalla sequenza amminoacidica. In alcuni casi, un polinucleotide

codificante una sequenza di marcatore è operativamente collegato a un polinucleotide codificante un dominio di segnalazione intracellulare. In alcuni casi, il polinucleotide codificante una sequenza di marcatore può anche avere uno o più siti enzimatici di restrizione in corrispondenza delle estremità 5' e/o 3' della sequenza codificante al fine di fornire una facile escissione e sostituzione del polinucleotide codificante una sequenza di marcatore con un altro polinucleotide codificante una differente sequenza di marcatore. In alcuni casi, il polinucleotide codificante una sequenza di marcatori è ottimizzato per codone per l'espressione nelle cellule di mammifero.

Vettori, cellule e metodi di trasduzione delle cellule

Selezione e sorting delle popolazioni di linfociti T.

[0115] Le composizioni descritte nella presente forniscono linfociti T CD4+ e/o CD8+. I linfociti T possono essere raccolti secondo tecniche note e arricchiti o impoveriti mediante tecniche note come il legame per affinità ad anticorpi come la citometria a flusso e/o la selezione immunomagnetica. Dopo le fasi di arricchimento e/o deplezione, l'espansione in vitro dei linfociti T desiderati può essere eseguita secondo tecniche note (incluse in via non limitativa quelle

descritte in Brevetto statunitense n. 6,040,177 concesso a Riddell et al.), o relative variazioni che risulteranno evidenti agli esperti del ramo. In alcuni casi, le cellule T sono cellule T autologhe ottenute dal paziente.

[0116] Per esempio, la popolazione o sottopopolazione di cellule T desiderata può essere espansa aggiungendo una popolazione iniziale di linfociti T a un terreno di coltura in vitro e quindi aggiungendo al terreno di coltura cellule alimentatrici, come cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC, Peripheral Blood Mononuclear Cell) non in divisione, (per esempio, in modo tale che la popolazione di cellule risultante contenga almeno circa 5, 10, 20 o 40 o più cellule di alimentazione PBMC per ciascun linfocita T nella popolazione iniziale da espandere); e incubando la coltura (per esempio per un tempo sufficiente per espandere il numero di cellule T). Le cellule di alimentazione non in divisione possono comprendere cellule di alimentazione PBMC irradiate con raggi gamma. In alcuni casi, le PBMC vengono irradiate con raggi gamma nell'intervallo compreso tra 3000 e 3600 rad per impedire la divisione cellulare. L'ordine di aggiunta delle cellule T e delle cellule di

alimentazione ai terreni di coltura può essere invertito se desiderato. La coltura può essere tipicamente incubata in condizioni di temperatura e simili adatte alla crescita dei linfociti T. Per la crescita dei linfociti T umani, per esempio, la temperatura sarà generalmente almeno di circa 25 gradi Celsius, preferibilmente almeno di circa 30 gradi, più preferibilmente di circa 37 gradi.

[0117] I linfociti T espansi includono linfociti T citotossici (CTL) $CD8^+$ e linfociti T helper $CD4^+$ che possono essere specifici per un antigene presente su un tumore umano o un patogeno.

[0118] Facoltativamente, il metodo di espansione può comprendere ulteriormente la fase di aggiunta di cellule linfoblastoidi (LCL) trasformate da EBV non in divisione come cellule di alimentazione. Le LCL possono essere irradiate con raggi gamma nell'intervallo da circa 6000 a 10.000 rad. Le cellule di alimentazione LCL possono essere fornite in qualsiasi quantità adatta, come un rapporto tra cellule di alimentazione LCL e linfociti T iniziali di almeno circa 10: 1.

[0119] Facoltativamente, il metodo di espansione può comprendere ulteriormente la fase di aggiunta di anticorpi anti-CD3 e/o anti CD28 al terreno di coltura

(per esempio, a una concentrazione di almeno circa 0,5 ng/ml). Facoltativamente, il metodo di espansione può comprendere ulteriormente la fase di aggiunta di IL-2 e/o IL-15 al terreno di coltura (per esempio, in cui la concentrazione di IL-2 è almeno di circa 10 unità/ml).

[0120] Dopo l'isolamento dei linfociti T, sia i linfociti T citotossici che quelli helper possono essere suddivisi in sottopopolazioni di cellule T naïve, di memoria ed effettrici prima o dopo l'espansione.

[0121] Le cellule CD8+ possono essere ottenute usando metodi standard. In alcuni casi, le cellule CD8+ vengono ulteriormente suddivise in cellule di memoria naïve, memoria centrali e memoria effettrici identificando gli antigeni della superficie cellulare associati a ciascuno di quei tipi di cellule CD8+. In alcuni casi, le cellule T della memoria sono presenti nei sottogruppi sia CD62L+ sia CD62L di linfociti del sangue periferico CD8+. Le PBMC vengono suddivise in frazioni CD62L-CD8+ e CD62L+ CD8+ dopo la colorazione con anticorpi anti-CD8 e anti-CD62L. In alcuni casi, l'espressione dei marcatori fenotipici di T_{CM} memoria centrali includono CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 e CD127 e sono negativi o bassi per granzima B. In alcuni

casi, le cellule T memoria centrali sono cellule T CD45RO+, CD62L+, CD8+. In alcuni casi, le T_E effettrici sono negative a CD62L, CCR7, CD28 e CD127 e positive a granzima B e perforina. In alcuni casi, i linfociti T CD8+ naïve sono caratterizzati dall'espressione di marcatori fenotipici di cellule T naïve tra cui CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD127 e CD45RA.

[0122] Se una cellula o una popolazione cellulare è positiva a un particolare marcatore di superficie cellulare può essere determinato mediante citometria a flusso usando la colorazione con un anticorpo specifico per il marcatore di superficie e un anticorpo di controllo corrispondente all'isotipo. Una popolazione cellulare negativa a un marcatore si riferisce all'assenza di colorazione significativa della popolazione cellulare con l'anticorpo specifico sopra il controllo isotipo, positivo si riferisce alla colorazione uniforme della popolazione cellulare sopra il controllo isotipo. In alcuni casi, una diminuzione dell'espressione di uno o dei marcatori si riferisce alla perdita di 1 log10 nell'intensità media della fluorescenza e/o alla diminuzione della percentuale di cellule che mostrano il marcatore di almeno circa il 20% delle cellule, 25% del cellule, 30% delle cellule,

35% delle cellule, 40% delle cellule, 45% delle cellule, 50% delle cellule, 55% delle cellule, 60% delle cellule, 65% delle cellule, 70% delle cellule, 75% delle cellule, 80% delle cellule, 85% delle cellule, 90% delle cellule, 95% delle cellule e 100% delle cellule e qualsiasi % tra il 20 e il 100% rispetto a una popolazione cellulare di riferimento. In alcuni casi, una popolazione cellulare positiva a uno o più marcatori si riferisce a una percentuale di cellule che mostrano il marcatore di almeno circa il 50% delle cellule, 55% delle cellule, 60% delle cellule, 65% delle cellule, 70% delle cellule, 75% delle cellule, 80% delle cellule, 85% delle cellule, 90% delle cellule, 95% delle cellule e 100% delle cellule e qualsiasi % tra il 50 e il 100% rispetto a una popolazione cellulare di riferimento.

[0123] Le cellule T helper CD4+ vengono suddivise in cellule naïve, memoria centrale e cellule effettrici identificando le popolazioni cellulari che hanno antigeni della superficie cellulare. I linfociti CD4+ possono essere ottenuti con metodi standard. In alcuni casi, i linfociti T CD4+ naïve sono cellule T CD45RO−, CD45RA+, CD62L+, CD4+. In alcuni casi, le cellule CD4+ memoria centrali sono CD62L+ e CD45RO+. In alcuni casi,

le cellule CD4+ effettrici sono CD62L- e CD45RO-.

[0124] In alcuni casi, le popolazioni di CD4+ e CD8+ che sono specifiche per l'antigene possono essere ottenute stimolando linfociti T naïve o antigene specifici con antigene. Per esempio, linee cellulari T antigene-specifiche o cloni possono essere generati per gli antigeni del citomegalovirus isolando le cellule T da soggetti infetti e stimolando le cellule in vitro con lo stesso antigene. Possono essere usate anche cellule T naïve. Qualsiasi numero di antigeni dalle cellule tumorali può essere usato come bersaglio per elicitare risposte a cellule T. In alcuni casi, le composizioni immunoterapiche cellulari adottive sono utili nel trattamento di una malattia o disturbo incluso un tumore solido, una malignità ematologica, un cancro mammario o un melanoma.

Modifica delle popolazioni di linfociti T.

[0125] In alcuni casi può essere desiderabile introdurre geni funzionali nelle cellule T da usare nell'immunoterapia. Per esempio, il gene o i geni introdotti possono migliorare l'efficacia della terapia promuovendo la vitalità e/o la funzione delle cellule T trasferite; oppure possono fornire un marcatore genetico per consentire la selezione e/o la valutazione

della sopravvivenza o migrazione in vivo; oppure possono incorporare funzioni che migliorano la sicurezza dell'immunoterapia, per esempio, rendendo la cellula suscettibile alla selezione negativa in vivo come descritto da Lupton SD et al., Mol. e Cell Biol., 11:6 (1991); e Riddell et al., Human Gene Therapy 3:319-338 (1992); vedere anche le pubblicazioni di PCT/LTS91/08442 e PCT/US94/05601 di Lupton et al. che descrivono l'uso di geni di fusione selezionabili bifunzionali derivati dalla fusione di un marcatore selezionabile positivo dominante con un marcatore selezionabile negativo. Ciò può essere eseguito secondo tecniche note (*vedere, per esempio,* Brevetto statunitense n. 6,040,177 di Riddell et al. alle colonne 14-17) o relative variazioni che risulteranno evidenti agli esperti del ramo in base alla presente descrizione.

[0126] In alcuni casi, le cellule T vengono modificate con recettori chimerici come descritto nella presente. In alcuni casi le cellule T vengono ottenute dal soggetto da trattare, in altri casi i linfociti vengono ottenuti da donatori umani allogenici, preferibilmente donatori umani sani.

[0127] In alcuni casi, i recettori chimerici

comprendono un dominio legante il ligando che si lega specificamente a una molecola di superficie della cellula tumorale, una regione distanziatrice polipeptidica, un dominio transmembrana e un dominio di segnalazione intracellulare come descritto nella presente. In alcuni casi, il dominio legante il ligando è un frammento di anticorpo a catena singola (scFv) che è derivato dalle catene pesanti variabili (VH) e leggere variabili (VL) di un anticorpo monoclonale (mAb). I segnali costimolatori possono anche essere forniti attraverso il recettore chimerico fondendo il dominio co-stimolatorio di CD28 e/o 4-1BB alla catena CD3ζ. I recettori chimerici sono specifici per le molecole della superficie cellulare indipendenti dall'HLA, superando così i limiti del riconoscimento del TCR, inclusa la restrizione HLA e bassi livelli di espressione di HLA sulle cellule tumorali.

[0128] I recettori chimerici possono essere costruiti con una specificità per qualsiasi marcatore di superficie cellulare usando frammenti leganti l'antigene o domini variabili dell'anticorpo di, per esempio, molecole di anticorpi. Le molecole di legame dell'antigene possono essere collegate a uno o più moduli di segnalazione cellulare. In alcuni casi, i

moduli di segnalazione cellulare includono dominio transmembrana CD3, domini di segnalazione intracellulare CD3 e domini transmembrana CD28. In alcuni casi, il dominio di segnalazione intracellulare comprende una transmembrana CD28 e un dominio di segnalazione collegato a un dominio intracellulare CD3 zeta. In alcuni casi, un recettore chimerico può anche includere un marcatore di trasduzione come tEGFR.

[0129] In alcuni casi, lo stesso o un differente recettore chimerico può essere introdotto in ciascuna popolazione di linfociti T CD4+ e CD8+. In alcuni casi, il recettore chimerico in ciascuna di queste popolazioni ha un dominio legante il ligando che si lega specificamente allo stesso ligando sul tumore o sulla cellula infetta. I moduli di segnalazione cellulare possono differire. In alcuni casi, il dominio di segnalazione intracellulare delle cellule T citotossiche CD8+ è lo stesso del dominio di segnalazione intracellulare delle cellule T helper CD4+. In altri casi, il dominio di segnalazione intracellulare delle cellule T citotossiche CD8+ è differente dal dominio di segnalazione intracellulare delle cellule T helper CD4+.

[0130] In alcuni casi, ciascuno dei linfociti T CD4 o

CD8 può essere suddiviso in cellule naïve, memoria centrale e memoria effettrici o effettrici prima della trasduzione come descritto nella presente. In casi alternativi, ciascuno dei linfociti T CD4 o CD8 può essere suddiviso in cellule naïve, memoria centrale, memoria effettrici o effettrici dopo la trasduzione.

[0131] Sono state sviluppate varie tecniche di trasduzione che usano particelle virali infettive ricombinanti per la distribuzione genica. Ciò rappresenta un approccio attualmente preferito alla trasduzione dei linfociti T. I vettori virali che sono stati usati in questo modo includono vettori virali derivati dal virus simiano 40, adenovirus, virus adeno-associato (AAV), vettori lentivirali e retrovirus. Pertanto, i metodi di trasferimento e di espressione genica sono numerosi ma essenzialmente funzionano per introdurre ed esprimere materiale genetico nelle cellule di mammifero. Molte delle tecniche di cui sopra sono state usate per trasdurre cellule ematopoietiche o linfoidi, inclusa la trasfezione con fosfato di calcio, la fusione di protoplasti, l'elettroporazione e l'infezione con adenovirus ricombinante, virus adeno-associato e vettori retrovirali. I linfociti T primari sono stati trasdotti con successo mediante

elettroporazione e infezione retrovirale o lentivirale.

[0132] I vettori retrovirali e lentivirali forniscono un metodo altamente efficiente per il trasferimento genico in cellule eucariotiche. Inoltre, l'integrazione retrovirale o lentivirale avviene in modo controllato e si traduce nell'integrazione stabile di una o poche copie della nuova informazione genetica per cellula.

[0133] È contemplato che la sovraespressione di un fattore stimolatorio (per esempio, una linfochina o una citochina) possa essere tossica per l'individuo trattato. Pertanto, rientra nell'ambito dell'invenzione includere segmenti genici che rendono le cellule T sensibili alla selezione negativa in vivo. Con "selezione negativa" si intende che la cellula infusa può essere eliminata come risultato di un cambiamento nelle condizioni in vivo dell'individuo. Il fenotipo selezionabile negativo può derivare dall'inserimento di un gene che conferisce sensibilità a un agente somministrato, per esempio un composto. I geni selezionabili negativi sono noti nel ramo e includono, fra l'altro, i seguenti: il gene di timidina chinasi di tipo I del virus Herpes simplex (HSV-I TK), che conferisce sensibilità al ganciclovir; il gene di ipoxantina fosforibosiltransferasi (HPRT) cellulare, il

gene di adenina fosforibosiltransferasi (APRT) cellulare e una citosina deaminasi batterica,

[0134] In alcuni casi può essere utile includere nelle cellule T un marcatore positivo che consenta la selezione delle cellule del fenotipo selezionabile negativo in vitro. Il marcatore selezionabile positivo può essere un gene che, una volta introdotto nella cellula ospite, esprime un fenotipo dominante che consente la selezione positiva delle cellule che trasportano il gene. I geni di questo tipo sono noti nel ramo e includono, fra l'altro, il gene di igromicina-B fosfotransferasi (hph) che conferisce resistenza all'igromicina B, il gene di ammino glicoside fosfotransferasi (neo o aph) da Tn5 che codifica la resistenza all'antibiotico G418, il gene di diidrofolato reduttasi (DHFR), il gene di adenosina deaminasi (ADA) e il gene di resistenza multi-farmaco (MDR).

[0135] Una varietà di metodi può essere impiegata per trasdurre i linfociti T, come è ben noto nel ramo. In alcuni casi, la trasduzione viene eseguita usando vettori lentivirali.

[0136] In alcuni casi, le cellule CD4+ e CD8+ possono essere modificate separatamente ciascuna con un vettore

di espressione codificante un recettore chimerico per formare popolazioni definite. In alcuni casi, queste cellule vengono quindi ulteriormente suddivise in sottopopolazioni di cellule effettive, memoria centrali e naïve come descritto sopra, selezionando gli antigeni della superficie cellulare unici per ciascuna di queste popolazioni cellulari. Inoltre, le popolazioni di cellule CD4+ o CD8+ possono essere selezionate in base al loro profilo di citochine o alle attività proliferative. Per esempio, possono essere selezionati i linfociti T CD4+ che hanno una maggiore produzione di citochine come IL-2, IL-4, IL-10, TNFα e IFNγ rispetto alle cellule trasdotte con sham o alle cellule CD8+ trasdotte quando stimolate con l'antigene. In altri casi, vengono selezionate cellule T CD4+ memoria centrali o naïve che hanno una produzione potenziata di IL-2 e/o TNFa. Allo stesso modo, le cellule CD8+ che hanno una maggiore produzione di IFNγ vengono selezionate rispetto alle cellule CD8+ trasdotte con sham.

[0137] In alcuni casi, vengono selezionate le cellule CD4+ e CD8+ che proliferano in risposta ad antigeni o ai bersagli tumorali. Per esempio, vengono selezionate cellule CD4+ che proliferano vigorosamente quando

stimolate con bersaglio antigeni o tumorali rispetto alle cellule trasdotte con sham, o cellule trasdotte con CD8+. In alcuni casi, vengono selezionate cellule CD4+ e CD8+ che sono citotossiche per le cellule recanti antigeni. In alcuni casi, ci si aspetta che le cellule CD4+ siano debolmente citotossiche rispetto alle cellule CD8+.

[0138] In un caso specifico, vengono selezionati linfociti trasdotti, come le cellule CD8+ memoria centrali, che provvedono all'uccisione delle cellule tumorali in vivo usando un modello animale stabilito per il particolare tipo di cancro. Tali modelli animali sono noti a coloro che sono esperti nel ramo ed escludono gli esseri umani. Come descritto nella presente, non tutti i costrutti di recettore chimerico trasdotti in linfociti conferiscono la capacità di uccidere le cellule tumorali in vivo nonostante la capacità di attivarsi e uccidere le cellule tumorali in vitro. In particolare, per alcune molecole bersaglio i linfociti T aventi costrutti di recettore chimerico con una regione distanziatrice lunga erano meno efficaci nell'uccidere le cellule tumorali in vivo rispetto alle cellule T aventi un recettore chimerico con una regione distanziatrice corta. Per altre molecole bersaglio, le

cellule T che hanno costrutti di recettore chimerico con una regione distanziatrice corta erano meno efficaci nell'uccidere le cellule tumorali in vivo rispetto alle cellule T che hanno recettori chimerici con una regione distanziatrice lunga.

[0139] In altri casi ancora, vengono selezionati i recettori chimerici trasdotti esprimenti cellule T che possono persistere in vivo usando un modello animale stabilito per il particolare tipo di cancro. In alcuni casi, è stato mostrato che le cellule memoria centrali del recettore chimerico trasdotto CD8+ con una breve regione distanziatrice persistono in vivo dopo l'introduzione nell'animale per circa 3 giorni o più, 10 giorni o più, 20 giorni o più, 30 giorni o più, 40 giorni o più o 50 giorni o più.

[0140] È contemplato che le combinazioni di cellule T CD4+ e CD8+ verranno usate nelle composizioni come descritto. In un caso, combinazioni di cellule CD4+ trasdotte con recettori chimerici possono essere combinate con cellule CD8+ trasdotte con recettori chimerici della stessa specificità del ligando o combinate con cellule T $CD8^+$ che sono specifiche per un distinto ligando tumorale. In altri casi, le cellule CD8+ trasdotte con recettore chimerico sono combinate

con le cellule CD4+ trasdotte con recettore chimerico specifiche per un differente ligando espresso sul tumore. In ancora un altro caso, le cellule CD4+ e CD8+ modificate con recettore chimerico vengono combinate. In alcuni casi, le cellule CD8+ e CD4+ possono essere combinate in rapporti differenti, per esempio, un rapporto 1:1 di CD8+ e CD4+, un rapporto di 10:1 tra CD8+ e CD4+ o un rapporto di 100:1 tra CD8+ e CD4+. In alcuni casi, la popolazione combinata viene testata per la proliferazione cellulare in vitro e/o in vivo ed è selezionato il rapporto di cellule che provvede alla proliferazione delle cellule.

[0141] È contemplato che le cellule CD4+ e CD8+ possano essere ulteriormente separate in sottopopolazioni, come le popolazioni di cellule di memoria naïve, memoria centrali e di memoria effettrice. Come descritto nella presente, in alcuni casi, le cellule CD4+ naïve sono cellule T positive CD45RO−, CD45RA+, CD62L+, CD4+. In alcuni casi, le cellule CD4+ memoria centrali sono positive a CD62L e positive a CD45RO. In alcuni casi, le cellule effettrici CD4+ sono CD62L negative e CD45RO positive. Ciascuna di queste popolazioni può essere modificata indipendentemente con un recettore chimerico.

[0142] Come descritto nella presente, in alcuni casi, le cellule T della memoria sono presenti in entrambi i sottogruppi CD62L+ e CD62L– di linfociti del sangue periferico CD8+. Le PBMC vengono suddivise in frazioni CD62L–CD8+ e CD62L+ CD8+ dopo la colorazione con anticorpi anti–CD8 e anti–CD62L. In alcuni casi, l'espressione dei marcatori fenotipici delle cellule T memoria centrali (TCM) include CD62L, CCR7, CD28, CD3 e CD127 ed esse sono negative o basse per granzima B. In alcuni casi, le cellule T memoria centrali sono cellule T CD45RO+, CD62L+, CD8+. In alcuni casi, le cellule T effettrici (T_E) sono negative a CD62L, CCR7, CD28 e CD127 e positive a granzima B e perforina. In alcuni casi, i linfociti T CD8+ naïve sono caratterizzati da CD8+, CD62L+, CD45RO+, CCR7+, CD28+ CD127+ e CD45RO+. Ciascuna di queste popolazioni può essere modificata indipendentemente con un recettore chimerico.

[0143] Dopo la trasduzione e/o la selezione di cellule recanti recettori chimerici, le popolazioni cellulari vengono preferibilmente espanse in vitro fino a ottenere un numero sufficiente di cellule per fornire almeno un'infusione in un soggetto umano, tipicamente circa da 10^4 cellule/kg a 10^9 cellule/kg. In alcuni casi, le cellule trasdotte vengono coltivate in

presenza di cellule recanti l'antigene, anti CD3, anti CD28 e IL 2, IL-7, IL 15, IL-21 e relative combinazioni.

[0144] Ciascuna delle sottopopolazioni di cellule CD4+ e CD8+ può essere combinata con le altre. In un caso specifico, le cellule CD4+ memoria centrali o naïve modificate sono combinate con le cellule T CD8+ memoria centrali modificate per fornire un effetto citotossico sinergico sulle cellule recanti antigeni, come le cellule tumorali.

Composizioni

[0145] È descritta una composizione di immunoterapia cellulare adottiva comprendente una preparazione cellulare di linfociti T geneticamente modificata come descritto nella presente.

[0146] In alcuni casi, la preparazione delle cellule dei linfociti T comprende cellule T CD4+ che hanno un recettore chimerico comprendente un dominio variabile anticorpo extracellulare specifico per un ligando associato alla malattia o disturbo, una regione distanziatrice personalizzabile, un dominio transmembrana e un dominio di segnalazione intracellulare di un recettore di cellule T o altri recettori come descritto nella presente. In altri casi,

una composizione di immunoterapia cellulare adottiva comprende inoltre una preparazione cellulare di linfociti T citotossici CD8+ specifiche per tumore modificate con recettore chimerico che fornisce una risposta immunitaria cellulare, in cui la preparazione cellulare di linfociti T citotossici comprende cellule T CD8+ che hanno un recettore chimerico comprendente un anticorpo extracellulare a catena singola specifico per un ligando associato alla malattia o disturbo, una regione distanziatrice personalizzabile, un dominio transmembrana e un dominio di segnalazione intracellulare di un recettore di cellula T come descritto nella presente. In alcuni casi, la popolazione di cellule T modificate con recettore chimerico può persistere in vivo per almeno 3 giorni o più a lungo.

[0147] In alcuni casi, una composizione di immunoterapia cellulare adottiva comprende una preparazione cellulare di linfociti T citotossici CD8+ specifiche per tumore modificate con recettore chimerico che fornisce una risposta immunitaria cellulare, in cui la preparazione cellulare di linfociti T citotossici comprende cellule T CD8+ che hanno un recettore chimerico comprendente un anticorpo

extracellulare a catena singola specifico per un ligando associato alla malattia o disturbo, una regione distanziatrice personalizzabile, un dominio transmembrana e un dominio di segnalazione intracellulare di un recettore di cellule T, in combinazione con una cellula CD4+ T helper naïve modificata con recettore chimerico reattivo con un antigene derivato da cellule T CD45RO-CD62L+ CD4+ e un veicolo farmaceuticamente accettabile.

[0148] In altri casi, una composizione di immunoterapia cellulare adottiva comprende una preparazione di cellule T citotossiche CD8+ specifiche per antigene che fornisce una risposta immunitaria cellulare derivata dal paziente combinata con una cellula T helper CD4+ naïve modificata con recettore chimerico reattivo con un antigene che potenzia la risposta immunitaria CD8+, in cui la preparazione cellulare di linfociti T helper comprende cellule T CD4+ che hanno un recettore chimerico comprendente un dominio variabile di anticorpo extracellulare specifico per l'antigene associato alla malattia o disturbo, una regione distanziatrice personalizzabile, un dominio transmembrana e un dominio di segnalazione intracellulare di un recettore di cellule T.

[0149] In un ulteriore caso, una composizione di immunoterapia cellulare adottiva comprende una cellula helper CD4+ T naïve modificata con recettore chimerico reattivo con un antigene che potenzia la risposta immunitaria CD8+, in cui la preparazione cellulare di linfociti T helper comprende cellule T CD4+ che hanno un recettore chimerico comprendente un dominio variabile anticorpo extracellulare specifico per un ligando associato a una malattia o disturbo, una regione distanziatrice personalizzabile, un dominio transmembrana e un dominio di segnalazione intracellulare di un recettore di cellule T.

[0150] In alcuni casi, la cellula di linfocita T helper CD4+ è selezionata dal gruppo consistente di cellule T CD4+ naïve, cellule T CD4+ memoria centrali, cellule T CD4+ memoria effettrici o cellule T CD4+ bulk (in massa). In alcuni casi, la cellula di linfocita helper CD4+ è una cellula T CD4+ naïve, in cui la cellula T CD4+ naïve comprende una cellula T CD45RO−, CD45RA+, CD62L+ CD4+. In alcuni casi, la cellula di linfocita T citotossico CD8+ è selezionata dal gruppo consistente di cellule T CD8+ naïve, cellule T CD8+ memoria centrale, cellule T CD8+ memoria effettrici o cellule T CD8+ bulk. In alcuni casi, la cellula di linfocita T

citotossico CD8+ è una cellula T memoria centrale in cui la cellula T memoria centrale comprende una cellula T CD45RO+, CD62L+, CD8+. In altri casi ancora, la cellula di linfocita T citotossico CD8+ è una cellula T memoria centrale e la cellula di linfocita T helper CD4+ è una cellula T CD4+ memoria centrale o naïve.

Metodi

[0151] Sono descritti metodi per produrre composizioni immunoterapiche adottive e usi o metodi per usare queste composizioni per effettuare immunoterapia cellulare in un soggetto che ha una malattia o disturbo. In alcuni casi, le cellule T modificate con recettore chimerico come descritto nella presente sono in grado di persistere in vivo per almeno 3 giorni, o almeno 10 giorni. In alcuni casi, le cellule T modificate con recettore chimerico come descritto nella presente possono proliferare in vivo per almeno 2, o almeno 3 generazioni, come determinato mediante diluizione del colorante CFSE. La proliferazione e la persistenza delle cellule T modificate con recettore chimerico possono essere determinate usando un modello animale della malattia o del disturbo e somministrando le cellule e determinando la persistenza e/o la capacità proliferativa delle cellule trasferite. In

altri casi, la proliferazione e l'attivazione possono essere testate in vitro attraverso molteplici cicli di attivazione con cellule recanti antigeni.

[0152] In alcuni casi, un metodo di produzione delle composizioni comprende ottenere una cellula helper CD4+ T naïve modificata, in cui la preparazione cellulare di linfociti T helper modificati comprende cellule T CD4+ che hanno un recettore chimerico comprendente un dominio legante il ligando specifico per una molecola di superficie della cellula tumorale, un dominio distanziatore personalizzato, un dominio transmembrana e un dominio di segnalazione intracellulare come descritto nella presente.

[0153] In un altro caso, un metodo comprende inoltre ottenere una cellula T citotossica CD8+ modificata, in cui la preparazione cellulare di linfociti T citotossici modificati comprende cellule CD8+ che hanno un recettore chimerico comprendente un dominio legante il ligando specifico per una molecola di superficie della cellula tumorale, un dominio distanziatore personalizzato, un dominio transmembrana e un dominio di segnalazione intracellulare come descritto nella presente.

[0154] In un altro caso, un metodo comprende ottenere

una cellula T citotossica CD8+ modificata, in cui la preparazione delle cellule di linfociti T citotossici modificate comprende cellule T CD8+ che hanno un recettore chimerico comprendente un dominio legante il ligando specifico per una molecola di superficie della cellula tumorale, un dominio distanziatore personalizzato, un dominio transmembrana e un dominio di segnalazione intracellulare come descritto nella presente, e inoltre comprendente combinare cellule T citotossiche CD8+ modificate con una preparazione cellulare di linfociti helper CD4+.

[0155] La preparazione delle cellule CD4+ e CD8+ che vengono modificate con un recettore chimerico è stata descritta sopra nonché negli esempi. I linfociti T antigene specifici possono essere ottenuti da un paziente affetto dalla malattia o disturbo oppure possono essere preparati mediante stimolazione in vitro dei linfociti T in presenza di antigene. Anche sottopopolazioni di linfociti T CD4+ e CD8+ che non sono selezionati per la specificità antigenica possono essere isolate come descritto nella presente e combinate nei metodi di produzione. In alcuni casi, la combinazione di popolazioni cellulari può essere valutata per l'uniformità dei marcatori di superficie

cellulare, la capacità di proliferare attraverso almeno due generazioni, per avere uno stato di differenziazione cellulare uniforme. Il controllo di qualità può essere effettuato mediante co-coltura di una linea cellulare che esprime il ligando bersaglio con cellule T modificate con recettore chimerico per determinare se le cellule T modificate con recettore chimerico riconoscono la linea cellulare usando saggio di citotossicità, proliferazione o produzione di citochine noti nel campo. Lo stato di differenziazione cellulare e i marcatori della superficie cellulare sui linfociti T modificati con recettore chimerico possono essere determinati mediante citometria a flusso. In alcuni casi, i marcatori e lo stato di differenziazione cellulare sulle cellule CD8+ includono CD3, CD8, CD62L, CD28, CD27, CD69, CD25, PD-1, CTLA-4, CD45RO e CD45RA. In alcuni casi, i marcatori e lo stato di differenziazione cellulare sulle cellule CD4+ includono CD3, CD4, CD62L, CD28, CD27, CD69, CD25, PD-1, CTLA-4 CD45RO e CD45RA.

[0156] In alcuni casi, nella presente è descritto un metodo per selezionare una regione distanziatrice per un recettore chimerico. Sorprendentemente alcuni costrutti di recettore chimerico, sebbene efficaci per

attivare le cellule T in vitro, non erano efficaci in vivo. In alcuni casi, un metodo comprende fornire una pluralità di acidi nucleici di recettore chimerico, in cui gli acidi nucleici di recettore chimerico differiscono soltanto nella regione distanziatrice; introdurre ciascuno degli acidi nucleici di recettore chimerico in una popolazione di linfociti T separata; espandere ciascuna popolazione di linfociti separata in vitro e introdurre ciascuna popolazione di linfociti in un animale portatore di un tumore per determinare l'efficacia anti-tumorale di ciascuna delle cellule T modificate con recettore chimerico e selezionare un recettore chimerico che fornisce efficacia anti-tumorale rispetto a ciascuna delle altre popolazioni di linfociti separate modificata con ciascuna delle altre cellule T modificate con recettore chimerico.

[0157] Sono noti modelli animali di differenti tumori. L'efficacia anti-tumorale può essere misurata identificando una diminuzione del volume tumorale, determinando la morte dell'animale, la persistenza delle cellule T geneticamente modificate in vivo, l'attivazione delle cellule T geneticamente modificate (per esempio, rilevando un aumento dell'espressione di CD25 e/CD69) e/o la proliferazione di cellule T

geneticamente modificate in vivo. In un caso, è selezionato un recettore chimerico che fornisce la migliore efficacia anti-tumorale in vivo determinata mediante uno o più di questi parametri. La mancanza di efficacia anti-tumorale può essere determinata dalla mancanza di persistenza dei linfociti geneticamente modificati in vivo, dalla morte degli animali, da un aumento dell'apoptosi misurata da un aumento dell'induzione della caspasi -3 e/o da una diminuzione della proliferazione dei linfociti geneticamente modificati.

[0158] In alcuni casi, il fatto di fornire una pluralità di acidi nucleici di recettore chimerico, in cui gli acidi nucleici di recettore chimerico differiscono soltanto nella regione distanziatrice comprende fornire un costrutto di recettore chimerico comprendente un polinucleotide codificante un dominio legante il ligando, in cui il ligando è un antigene specifico per tumore, un antigene virale o qualsiasi altra molecola espressa su una popolazione di cellule bersaglio che sia adatta a mediare il riconoscimento e l'eliminazione da parte di un linfocita; un polinucleotide codificante un primo distanziatore polipeptidico avente un sito di restrizione definito in

corrispondenza dell'estremità 5' e 3' della sequenza codificante il primo distanziatore polipeptidico; un polinucleotide codificante un dominio transmembrana; e un polinucleotide codificante un dominio di segnalazione intracellulare.

[0159] Sono descritti metodi per effettuare l'immunoterapia cellulare in un soggetto che ha una malattia o disturbo comprendente: somministrare una composizione di linfociti esprimenti un recettore chimerico come descritto nella presente. In altri casi, un metodo comprende somministrare al soggetto una preparazione cellulare di linfociti T citotossici geneticamente modificati che fornisce una risposta immunitaria cellulare, in cui la preparazione delle cellule di linfociti T citotossici comprende cellule T CD8+ che hanno un recettore chimerico comprendente un dominio legante il ligando specifico per una molecola di superficie della cellula tumorale, un dominio distanziatore personalizzato, un dominio transmembrana e un dominio di segnalazione intracellulare come descritto nella presente, e un preparazione cellulare di linfociti T helper geneticamente modificati che stimola il riconoscimento diretto del tumore e potenzia la capacità di preparazioni cellulari di linfociti T

citotossici geneticamente modificati di mediare una risposta immunitaria cellulare, in cui la preparazione di cellule di linfociti T helper comprende cellule T CD4+ che hanno un recettore chimerico comprendente un dominio legante il ligando specifico per una molecola di superficie della cellula tumorale, un dominio distanziatore personalizzato, un dominio transmembrana e un dominio di segnalazione intracellulare come descritto nella presente.

[0160] Pur non limitando l'ambito della descrizione, si ritiene che la selezione della popolazione di cellule T modificate con recettori chimerici che possono persistere e proliferare in vivo prima della somministrazione possa avere come risultato la capacità di usare una dose inferiore di cellule T e fornire un'attività terapeutica più uniforme. In alcuni casi, la dose di cellule T può essere ridotta almeno del 10%, 20% o 30% o più. La riduzione della dose di cellule T può essere utile per ridurre il rischio o la sindrome da lisi tumorale e la tempesta di citochine.

[0161] In un altro caso, un metodo per effettuare l'immunoterapia cellulare in soggetti affetti da una malattia o disturbo comprende: somministrare al soggetto una preparazione cellulare di linfociti T

helper geneticamente modificati, in cui la preparazione cellulare di linfociti T helper modificati comprende cellule T CD4+ che hanno un recettore chimerico comprendente un dominio legante il ligando specifico per una molecola di superficie della cellula tumorale, un dominio distanziatore personalizzato, un dominio transmembrana e un dominio di segnalazione intracellulare come descritto nella presente. In alcuni casi, il metodo comprende inoltre somministrare al soggetto una preparazione cellulare di linfociti T citotossici geneticamente modificati, in cui la preparazione cellulare di linfociti T citotossici modificati comprende cellule CD8+ che hanno un recettore chimerico comprendente un dominio legante il ligando specifico per una molecola di superficie della cellula tumorale, un dominio distanziatore personalizzato, un dominio transmembrana e un dominio di segnalazione intracellulare come descritto nella presente.

[0162] Un altro esempio descrive un metodo per effettuare l'immunoterapia cellulare in un soggetto affetto da una malattia o disturbo che comprende: analizzare un campione biologico del soggetto per la presenza di una molecola bersaglio associata alla

malattia o disturbo e somministrare le composizioni di immunoterapia adottiva descritte nella presente, in cui il recettore chimerico si lega specificamente alla molecola bersaglio.

[0163] In alcuni casi, la cellula di linfocita T helper CD4+ è selezionata prima dell'introduzione del recettore chimerico dal gruppo consistente di cellule T CD4+ naïve, cellule T CD4+ memoria centrali, cellule T CD4+ memoria effettrici o cellule T CD4+ bulk. In un caso specifico, la cellula di linfocita helper CD4+ è una cellula T CD4+ naïve, in cui la cellula T CD4+ naïve comprende una cellula T CD45RO−, CD45RA+, CD62L+ CD4+. In altri casi ancora, la cellula di linfocita T citotossico CD8+ è selezionata prima dell'introduzione del recettore chimerico dal gruppo consistente di cellule T CD8+ naïve, cellule T CD8+ memoria centrali, cellule T CD8+ memoria effettrici o cellule T CD8+ bulk. In un caso specifico, la cellula di linfocita T citotossico CD8+ è una cellula T memoria centrale in cui la cellula T memoria centrale comprende una cellula T CD45RO+, CD62L+, CD8+. In un caso specifico, la cellula di linfocita T citotossico CD8+ è una cellula T memoria centrale e la cellula di linfocita T helper CD4+ è una cellula T CD4+ naïve.

[0164] In alcuni casi, la cellula T CD8+ e la cellula T CD4+ sono entrambe geneticamente modificate con un recettore chimerico comprendente un dominio di catena pesante anticorpale che lega specificamente una molecola di superficie cellulare specifica per tumore. In altri casi, il dominio di segnalazione intracellulare delle cellule T citotossiche CD8 è identico al dominio di segnalazione intracellulare delle cellule T helper CD4. In altri casi ancora, il dominio di segnalazione intracellulare delle cellule T citotossiche CD8 è differente dal dominio di segnalazione intracellulare delle cellule T helper CD4.

[0165] I soggetti che possono essere trattati sono, in generale, soggetti umani e altri primati, come scimmie per scopi di medicina veterinaria. I soggetti possono essere maschi o femmine e possono essere di qualsiasi età adatta, inclusi soggetti neonati, giovani, adolescenti, adulti e geriatrici.

[0166] I metodi sono utili nel trattamento, per esempio, di tumori maligni ematologici, melanoma, cancro mammario e altre neoplasie epiteliali o tumori solidi. In alcuni casi, la molecola associata alla malattia o disturbo è selezionata dal gruppo consistente di recettore tirosin chinasi orfano ROR1,

Her2, CD19, CD20, CD22, mesotelina, CEA e antigene di superficie dell'epatite B.

[0167] I soggetti che possono essere trattati includono soggetti affetti da cancro, inclusi in via non limitativa cancro a colon, polmone, fegato, mammella, reni, prostata, ovaio, pelle (incluso il melanoma), ossa e cervello, ecc. In alcuni casi sono note molecole o antigeni associati al tumore, come melanoma, cancro mammario, carcinoma a cellule squamose, cancro al colon, leucemia, mieloma e cancro alla prostata. In altri casi, le molecole associate al tumore possono essere bersagliate con cellule T geneticamente modificate esprimenti un recettore chimerico ingegnerizzato. Gli esempi includono, in via non limitativa, linfoma a cellule B, cancro mammario, cancro alla prostata e leucemia.

[0168] Cellule preparate come descritto sopra possono essere usate in metodi e composizioni per immunoterapia adottiva secondo tecniche note, o loro variazioni che risulteranno evidenti agli esperti del ramo in base alla presente descrizione.

[0169] In alcuni casi, le cellule vengono formulate raccogliendole prima dal loro terreno di coltura, quindi lavando e concentrando le cellule in un terreno

e un sistema contenitore adatto per la somministrazione (un veicolo “farmaceuticamente accettabile”) in una quantità efficace per il trattamento. Il terreno di infusione adatto può essere qualsiasi formulazione di terreno isotonico, tipicamente soluzione salina normale, Normosol R (Abbott) o Plasma-Lyte A (Baxter), ma può essere usato anche destrosio al 5% in acqua o lattato di Ringer. Il terreno di infusione può essere integrato con sieroalbumina umana, siero bovino fetale o altri componenti del siero umano.

[0170] Una quantità efficace di trattamento delle cellule nella composizione è di almeno 2 sottoinsiemi di cellule (per esempio, 1 sottoinsieme di cellule T memoria centrali CD8+ e 1 sottoinsieme di cellule T helper CD4+) o è più tipicamente maggiore di 10^2 cellule e fino a 10^6, fino, e incluse, a 10^8 o 10^9 cellule e può essere più di 10^{10} cellule. Il numero di cellule dipenderà dall’uso finale per il quale è intesa la composizione nonché il tipo di cellule incluse in esse. Per esempio, se sono desiderate cellule specifiche per un particolare antigene, la popolazione conterrà più del 70%, generalmente più dell’80%, 85% e 90-95% di tali cellule. Per gli usi descritti nella presente, le cellule sono generalmente in un volume di

un litro o meno, possono essere 500 ml o meno, anche 250 ml o 100 ml o meno. Quindi la densità delle cellule desiderate è tipicamente maggiore di 10^4 cellule/ml e generalmente è maggiore di 10^7 cellule/ml, generalmente 10^8 cellule/ml o superiore. Il numero clinicamente rilevante di cellule immunitarie può essere suddiviso in molteplici infusioni cumulativamente uguali o superiori a 10^6, 10^7, 10^8, 10^8, 10^9, 10^{10} o 10^{11} cellule.

[0171] In alcuni casi, i linfociti possono essere usati per conferire immunità agli individui. Con “immunità” si intende una diminuzione di uno o più sintomi fisici associati a una risposta a un’infezione da parte di un patogeno, o di un tumore, a cui è diretta la risposta dei linfociti. La quantità di cellule somministrate è solitamente nell’intervallo presente in individui normali con immunità al patogeno. Pertanto, le cellule vengono solitamente somministrate per infusione, ciascuna infusione in un intervallo da 2 cellule, fino ad almeno 10^6 – $3x10^{10}$ cellule, preferibilmente nell’intervallo di almeno 10^7 – 10^9 cellule. Le cellule T possono essere somministrate mediante una singola infusione o più infusioni in un intervallo di tempo. Tuttavia, poiché è previsto che differenti individui possano variare in termini di reattività, il tipo e la

quantità di cellule infuse, nonché il numero di infusioni e l'intervallo di tempo in cui vengono somministrate più infusioni sono determinati dal medico curante e possono essere determinati dalla visita medica di routine. La generazione di livelli sufficienti di linfociti T (inclusi linfociti T citotossici e/o linfociti T helper) è facilmente ottenibile usando il metodo di espansione rapida, come esemplificato nella presente. Vedere, *per esempio,* Brevetto statunitense n. 6,040,177 concesso a Riddell et al. alla colonna 17.

[0172] In alcuni casi, la composizione come descritto nella presente viene somministrata per via endovenosa, intraperitoneale, intratumorale, nel midollo osseo, nel linfonodo e/o nel liquido cerebrospinale. In alcuni casi, le composizioni ingegnerizzate con recettori chimerici vengono rilasciate nel sito del tumore. In alternativa, le composizioni come descritte nella presente possono essere combinate con un composto che indirizza le cellule al tumore o ai compartimenti del sistema immunitario ed evita siti come il polmone.

[0173] In alcuni casi, le composizioni come descritte nella presente vengono somministrate con agenti chemioterapici e/o immunosoppressori. In un caso, un

paziente viene dapprima trattato con un agente chemioterapico che inibisce o distrugge altre cellule immunitarie seguito dalle composizioni descritte nella presente. In alcuni casi, la chemioterapia può essere completamente evitata.

[0174] Ulteriori esempi sono illustrati negli esempi riportati di seguito.

ESPERIMENTI

Esempio I. Personalizzazione della lunghezza del dominio distanziatore e dell'affinità scFv per il riconoscimento ottimale di ROR1 con cellule T modificate con recettore chimerico

[0175] Abbiamo costruito recettori chimerici specifici per la molecola ROR1 che viene espressa su un gran numero di tumori maligni umani tra cui leucemia linfocitica cronica, linfoma a cellule mantellari, leucemia linfoblastica acuta e cancro al seno, alla prostata polmonare, al pancreas e al cancro ovarico. I recettori chimerici ROR1 sono stati progettati da scFV specifici per ROR1 con differenti affinità e contenenti domini distanziatori IgG4-Fc extracellulari di differenti lunghezze. È stata analizzata la capacità delle cellule T esprimenti ciascun recettore chimerico specifico per ROR-1 di riconoscere tumori ematopoietici

ROR1$^+$ ed epiteliali *in vitro,* e di eliminare il linfoma a cellule mantellari umane attecchito in topi immunodeficienti.

Materiali e metodi

Soggetti umani

[0176] Cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC) sono state ottenute da donatori sani e pazienti dopo il consenso informato scritto sui protocolli di ricerca approvati dall'Institutional Review Board del Fred Hutchinson Cancer Research Center (FHCRC).

Linee cellulari

[0177] Le linee cellulari K562, Raji, JeKo-1, MDA-MB-231, MDA-MB-468 e 293T sono state ottenute dalla American Type Colture Collection. Il Dr. Edus H. Warren (FHCRC) ha gentilmente fornito le linee di cancro delle cellule renali FARP, TREP e RWL. K562/ROR1 e Raji/ROR1 sono stati generati mediante trasduzione lentivirale con il gene ROR1 *a lunghezza intera*. Per derivare JeKo-1/ffluc, le cellule native JeKo-1 sono state trasdotte con un vettore lentivirale codificante il gene di *luciferasi di lucciola (ffluc)*- a monte di una sequenza T2A e eGFP. Cellule JeKo-1 trasdotte sono state sottoposte a sorting per l'espressione di eGFP ed espanse per esperimenti *in vivo*.

Immunofenotipizzazione

[0178] PBMC e linee cellulari sono state colorate con i seguenti mAb coniugati: CD3, CD4, CD5, CD8, CD19, CD28, CD45RO, CD62L, CD314 (NKG2D), MICA/B e controlli abbinati per isotipo (BD Biosciences). La colorazione con ioduro di propidio (PI) è stata effettuata per la discriminazione delle cellule vive/morte. L'espressione sulla superficie cellulare di ROR1 è stata analizzata usando un anticorpo policlonale di capra anti-RORl umano (R&D Systems).

[0179] L'espressione di superfice del recettore chimerico ROR1 2A2 è stata analizzata usando un anticorpo policlonale di capra anti-IgG di topo (specifico per Fab) (Jackson ImmunoResearch). Le analisi di flusso sono state eseguite su un FACSCanto®, le purificazioni per sorting su un FACSAriaII® (Becton Dickinson) e i dati analizzati usando il software FlowJo® (Treestar).

Costruzione di vettori e preparazione di lentivirus codificanti recettori chimerici

[0180] I recettori chimerici specifici per ROR1 e CD19 sono stati costruiti usando segmenti di catena VL e VH degli mAb 2A2, R12 e R11 (ROR1) e FMC63 mAb (CD19). (Le sequenze di regioni variabili per R11 e R12 sono

fornite in Yang et al, Plos One 6(6):e21018, Giugno 15, 2011) Ciascun scFV era collegato da un peptide $(G_4S)_3$ (SEQ ID NO:12) a un dominio distanziatore derivato da IgG4-Fc (Database Uniprot: P01861, SEQ ID NO:13) comprendente sequenze "Cerniera-CH2-CH3" (229 AA, SEQ ID NO:), "Cerniera-CH3" (119 AA, SEQ ID NO:) o solo "Cerniera" (12 AA, SEQ. ID NO:4) **(Figura 1)**. Tutti i distanziatori contenevano una sostituzione S→P all'interno del dominio "Cerniera" situato in corrispondenza della posizione 108 della proteina IgG4-Fc nativa, ed erano collegati al dominio transmembrana di 27 AA di CD28 umano (Uniprot: P10747, SEQ ID NO:14) e a un modulo di segnalazione comprendente (i) il dominio citoplasmatico di 41 AA di CD28 umano con una sostituzione LL→GG situata in corrispondenza delle posizioni 186-187 della proteina CD28 nativa (SEQ ID NO:14) o (ii) il dominio citoplasmatico di 42 AA di 4-1BB umano (Uniprot: Q07011, SEQ ID NO:15), ciascuno dei quali era collegato al dominio citoplasmatico di 112 AA dell'isoforma 3 di CD3ζ umano (Uniprot: P20963, SEQ ID NO; 16). Il costrutto codifica un elemento di salto ribosomiale T2A (SEQ ID NO:8)) e una sequenza tEGFR (SEQ ID NO:9) a valle del recettore chimerico. Le sequenze nucleotidiche ottimizzate per codone

codificanti ciascun transgene sono state sintetizzate (Life Technologies) e clonate nel vettore lentivirale epHIV7

[0181] Recettore chimerico ROR1, recettore chimerico CD19 o lentivirus codificante tEGFR sono stati prodotti in cellule 293T usando i vettori di impaccamento pCHGP-2, pCMV-Rev2 e pCMV-G e il reagente di trasfezione Calphos® (Clontech).

Generazione di linee di cellule T esprimenti recettori chimerici ROR1 e CD19

[0182] Cellule T memoria centrali CD8+ CD45RO+ CD62L+ (TCM) o cellule T bulk CD4+ sono state sottoposte a sorting da PBMC di donatori normali, attivate con palline anti-CD3/CD28 (Life Technologies) e trasdotte al giorno 3 dopo l'attivazione mediante centrifugazione a 800 g per 45 min a 32° C con supernatante lentivirale (MOI = 3) integrato con 1 µg/ml di polibrene (Millipore). Le cellule T sono state espanse in RPMI con il 10% di siero umano, 2 mM di L-glutammina e 1% di penicillina-streptomicina (terreno CTL), integrate con IL-2 umana ricombinante a una concentrazione finale di 50 U/ml. Il sottogruppo $tEGFR^+$ di ciascuna linea di cellule T è stato arricchito mediante selezione immunomagnetica con mAb anti-EGFR coniugato con biotina

(Sistemi ImClone) e palline di streptavidina (Miltenyi). Cellule T con recettore chimerico ROR1 e tEGFR di controllo sono state espanse usando un protocollo di espansione rapida (Riddell SR, Greenberg PD, The use of anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies to clone and expand human antigen-specific T cells J Immunol Methods. 1990;128(2):189-201. Epub 1990/04/17.), e le cellule T modificate con recettore chimerico CD19 sono state espanse mediante stimolazione con B-LCL irradiato (8.000 rad) con un rapporto cellule T:LCL di 1:7. Le cellule T sono state coltivate in terreno CTL con 50 U/ml di IL-2.

Citotossicità, secrezione di citochine e saggi di proliferazione

[0183] Le cellule bersaglio sono state etichettate con ^{51}Cr (PerkinElmer), lavate e incubate in triplicato a 1-2x10^3 cellule/pozzetto con cellule T modificate con recettore chimerico effettore a vari rapporti tra effettore e bersaglio (E:T). I supernatanti sono stati raccolti per il conteggio γ dopo un'incubazione di 4 ore e la lisi specifica è stata calcolata usando la formula standard. Per l'analisi della secrezione di citochine, 5x10^4 cellule T sono state piastrate in triplicato con cellule bersaglio con un rapporto E:T di

1:1 (CLL primaria), 2:1 (Raji/ROR1; JeKo-1), 4:1 (K562/ROR1, K562/CD19 e K562) o 10:1 (MDA-MB-231) e IFN-γ, TNF-α e IL-2 sono stati misurati mediante saggio immunologico ELISA o di citochine multiplex (Luminex) nel supernatante rimosso dopo 24 ore di incubazione. Negli esperimenti di blocco della segnalazione di NKG2D, anti-NKG2D (clone 1D11), anti-MICA/B (clone 6D4, tutto da BD) e anti-ULBP (gentilmente fornito dalla dott.ssa Veronika Groh, FHCRC) sono stati usati a concentrazioni saturanti. Per l'analisi della proliferazione, le cellule T sono state etichettate con 0,2 μM di carbossifluoresceina succinimidil estere (CFSE, Invitrogen), lavate e piastrate in triplicato con cellule stimolatrici in terreno senza citochine esogene. Dopo 72 ore di incubazione, le cellule sono state etichettate con mAb anti-CD8 e PI e analizzate mediante citometria a flusso per valutare la divisione cellulare delle Cellule T vive $CD8^+$.

Esperimenti in topi NOD/SCID/$\gamma c^{-/-}$ (NSG)

[0184] L'Institutional Animal Chimeric receptor and Use Committee ha approvato tutto gli esperimenti sui topi. Topi femmina di età compresa tra 6 e 8 settimane NOD.Cg-Prkdc ^{scid}Il2rg ^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) sono stati ottenuti dal Jackson Laboratory o allevati internamente. Ai topi

sono state iniettate $0,5x10^6$ cellule tumorali JeKo-1/ffluc attraverso la vena della coda ed essi ricevevano una successiva iniezione nella vena della coda di cellule T modificate con recettore chimerico o di controllo.

[0185] Per la rappresentazione per immagini di bioluminescenza della crescita tumorale, i topi ricevevano iniezioni intraperitoneali di substrato di luciferina (Caliper Life Sciences) risospeso in PBS (15 µg/g di peso corporeo). I topi sono stati anestetizzati con isoflurano e sottoposti a imaging usando un Xenogen IVIS Imaging System (Caliper) 10, 12 e 14 minuti dopo l'iniezione di luciferina in modalità "small binning" a un tempo di acquisizione da 1 s a 1 min per ottenere immagini insature. L'attività della luciferasi è stata analizzata usando Living Image Software (Caliper) e il flusso di fotoni è stato analizzato all'interno di regioni di interesse che racchiudevano l'intero corpo o il torace di ogni singolo topo.

Analisi statistiche

[0186] Le analisi statistiche sono state effettuate usando Prism Software (GraphPad®). Il test t di Student è stato effettuato come test accoppiato a due code con un intervallo di confidenza del 95% e risultati con un

valore p di p< 0,05 sono stati considerati significativi. L'analisi statistica della sopravvivenza è stata eseguita mediante test dei ranghi logaritmici e risultati con un valore p di p< 0,05 sono considerati significativi.

Risultati

Il troncamento del dominio distanziatore del recettore chimerico ROR1 2A2 conferisce un riconoscimento superiore di tumori ROR1$^+$

[0187] Abbiamo precedentemente riportato la progettazione di un recettore chimerico specifico per ROR1 usando l'scFV 2A2, che si lega a un epitopo nella porzione NH2-terminale, distale alla membrana simil Ig/Frizzled di ROR1-1. Il recettore chimerico ROR1 2A2 iniziale aveva un distanziatore lungo 229 AA che includeva la regione "Cerniera-CH2-CH3" di IgG4-Fc e incorporava domini costimolatori CD28 e di segnalazione CD3ζ (Hudecek M et al. Blood, 2010). Questo recettore chimerico conferiva un riconoscimento specifico di tumori ROR1$^+$, ma abbiamo ipotizzato che a causa della posizione distale alla membrana dell'epitopo ROR1, il troncamento del dominio distanziatore potesse migliorare il riconoscimento del tumore e la segnalazione delle cellule T. Pertanto, abbiamo

costruito 2 recettori chimerici aggiuntivi in cui il dominio distanziatore IgG4-Fc è stato deleto sequenzialmente per derivare le varianti “Cerniera-CH3” (119 AA, intermedio) e “solo cerniera” (12 AA, corto). Ciascuno dei nuovi recettori conteneva identici moduli di segnalazione 2A2 scFV e CD28 e CD3ζ. La cassetta di transgene includeva un EGFR troncato (tEGFR) per fungere da marcatore di trasduzione, selezione e tracciamento *in vivo* per le cellule T modificate con recettore chimerico.

[0188] Abbiamo trasdotto T^{CM} $CD8_+$ purificate con i recettori chimerici ROR1 2A2 contenenti distanziatori IgG4-Fc a lunghezza intera o troncati e con un vettore di controllo tEGFR. L’efficienza di trasduzione media era del 15% (intervallo 9-22%) e le cellule T positive al transgene sono state arricchite per una purezza uniforme (> 90%) al giorno 10 mediante selezione per l’espressione di tEGFR ed espanso (Figura 2A). L’espressione di superficie di ciascuno dei recettori chimerici è stata confermata mediante colorazione con anticorpi specifici per F(ab) (Figura 2A).

[0189] L’analisi della funzione *in vitro* di cellule T $CD8^+$ modificate per esprimere ciascuno dei recettori chimerici ROR1 2A2 hanno dimostrato che ciascun

recettore conferiva una lisi specifica di cellule MCL JeKo-1 e CLL primarie che esprimono naturalmente ROR1 e di cellule K562 che erano state trasdotte con *ROR1*, ma non conferiva il riconoscimento dei bersagli ROR1$^-$ di controllo (Figura 2B). Le cellule T esprimenti il recettore chimerico ROR1 2A2 corto "solo cerniera" avevano la massima attività citolitica e una gerarchia ((corto>intermedio>>lungo) di lisi tumorale era chiaramente evidente contro tutti i bersagli tumorali ROR1$^+$ (Figura 2B), illustrando l'importanza della lunghezza del dominio distanziatore sul riconoscimento di cellule tumorali ROR1$^+$.

[0190] L'efficacia anti-tumorale della terapia con cellule T adottive è correlata alla proliferazione e sopravvivenza di cellule T trasferite, che possono essere alterate dalla segnalazione attraverso il recettore chimerico. Abbiamo usato i saggi di diluizione di CFSE per analizzare la proliferazione di cellule T modificate con ciascuno dei recettori chimerici ROR1 2A2 dopo l'impegno di Raji/ROR1 o CLL e abbiamo riscontrato che il costrutto distanziatore corto promuoveva la massima proliferazione di cellule T dopo la stimolazione (Figura 2C). Per garantire che la maggiore proliferazione non fosse associata a una

maggiore morte cellulare indotta da attivazione (AICD), abbiamo anche analizzato la proporzione di cellule T modificate con recettore chimerico 2A2 ROR 1 che sono state colorate con ioduro di propidio (PI) dopo stimolazione con cellule tumorali Raji/ROR1 e JeKo-1. Abbiamo rilevato una frequenza molto più bassa di cellule T $PI^{+}CD8+$ nella linea di cellule T modificate con i distanziatori corti (Raji/ROR1: 17,2%/JeKo-1: 20,2%) rispetto ai distanziatori intermedi (41,6%/42,4%) e lunghi (44,5%/48,5%).

[0191] L'analisi quantitativa della produzione di citochine in risposta alla stimolazione con cellule Raji/ROR1 e CLL primarie mostrava la produzione di IFN-γ, TNF-α e IL-2 da parte delle cellule T esprimenti ciascuno dei recettori chimerici ROR1 2A2. Come osservato nei saggi di citotossicità, il costrutto distanziatore corto era superiore nel mediare la secrezione di citochine dopo il riconoscimento del tumore (Figura 2D). Pertanto, questa analisi mostra che il troncamento del dominio distanziatore extracellulare IgG4-Fc del recettore chimerico ROR1 2A2 porta a un aumento significativo della citotossicità, proliferazione e funzioni effettrici *in vitro* dopo il riconoscimento del tumore.

Lo scFv R11 specifico per un epitopo prossimale alla membrana nel dominio Kringle ROR1 richiede un dominio distanziatore extracellulare lungo.

[0192] Abbiamo trasdotto cellule T $CD8^+$ purificate con recettori chimerici ROR1 contenenti R11 scFv specifico per il dominio Kringle di ROR1 e contenenti distanziatori IgG4-Fc a lunghezza intera o troncati (solo cerniera e CH3). L'efficienza di trasduzione con ciascuno dei vettori corto (solo cerniera IgG4), intermedio (cerniera IgG4/CH3) e lungo (cerniera IgG4/CH2/CH3) era comparabile (45-51%) come misurato dall'espressione di EGFR. (Figura 3A). Le cellule T trasdotte con ciascuno dei vettori sono state saggiate per citolisi (Figura 3 B), proliferazione (Figura 3C) e produzione di citochine (Figura 3D) in risposta a cellule di leucemia o linfoma che esprimevano o meno ROR1. Come mostrato, soltanto le cellule T trasdotte con il recettore chimerico R11 contenente una lunga sequenza distanziatore erano in grado di riconoscere in modo efficiente i tumori ROR1+ e mediare le funzioni effettrici.

I recettori chimerici ROR1 derivati da un mAb R12 con affinità maggiore di 2A2 mediano una reattività anti-tumorale superiore

[0193] Successivamente abbiamo esaminato se l'aumento dell'affinità del scFV usato per costruire il recettore chimerico ROR1 potrebbe influenzare il riconoscimento del tumore e la funzione delle cellule T. Abbiamo generato recettori chimerici specifici per ROR1 dal mAb R12 che come 2A2, si lega a un epitopo nel dominio Ig/Frizzled NH2-terminale di ROR1 ma con affinità di legame monovalente > 50 volte superiore.

[0194] I recettori chimerici ROR1 R12 sono stati costruiti con distanziatori IgG4-Fc sia lunghi che corti per determinare se la progettazione ottimale del distanziatore per questo scFV di affinità più elevata differisse da quella per un scFV di affinità inferiore. Abbiamo riscontrato che similmente a 2A2, il recettore chimerico ROR1 R12 con distanziatore corto conferiva una migliore attività citolitica, secrezione e proliferazione di citochine (dati non mostrati), suggerendo che la lunghezza più corta del distanziatore fornisce un coinvolgimento spaziale superiore delle cellule T e cellula bersaglio ROR1^{+} per l'attivazione delle cellule T.

[0195] Abbiamo quindi progettato i recettori chimerici R12 e ROR1 2A2 che contenevano un distanziatore extracellulare ottimale (corto) e un dominio co-

stimolatorio CD28 o 4-1BB in tandem con CD3ζ (4 costrutti) per il confronto (Figura 4A,B). Questi costrutti di recettore chimerico ROR1 sono stati espressi in T^{CM} $CD8_+$ di donatori sani e abbiamo confermato l'espressione del transgene equivalente mediante la colorazione tEGFR (Figura 5A). Le cellule T modificate con ciascuno dei recettori chimerici ROR1 2A2 e R12 hanno lisato specificamente le cellule tumorali K562/ROR1 e Raji/ROR1 con efficienza approssimativamente equivalente (Figura 5B). Tuttavia, l'analisi della produzione di citochine mostrava che i recettori chimerici ROR1 R12 ad alta affinità che contenevano CD28 o 4-1BB conferivano una produzione di IFN-γ, TNF-α e IL-2 significativamente più alta rispetto ai corrispondenti costrutti 2A2 (Figura 5C). Abbiamo riscontrato che le cellule T esprimenti recettori chimerici con un dominio co-stimolatorio CD28 producevano più IFN-γ, TNF-α e IL-2 rispetto a quelle con 4-1BB.

[0196] Gli esperimenti per analizzare la proliferazione delle cellule T con recettore chimerico ROR1 mostravano una percentuale più alta di cellule T proliferanti e un numero maggiore di divisioni cellulari nelle cellule T esprimenti i recettori chimerici ROR1 R12 ad alta

affinità con dominio CD28 e 4-1BB rispetto a cellule T esprimenti le rispettive controparti 2A2 (Figura 4D). Vi era una proliferazione più vigorosa nelle cellule T che esprimevano recettori chimerici con un dominio CD28, coerente con una maggiore produzione di IL-2 indotta da questi recettori. Vi era una frequenza più bassa di AICD misurata dalla colorazione PI nelle linee di cellule T modificate con R12 rispetto ai recettori chimerici ROR1 2A2 dopo stimolazione rispettivamente con cellule tumorali Raji/ROR1 e JeKo-1 (R12: 5,6%/6,9% vs. 2A2: 10%/9,65%). Le linee di cellule T che esprimevano recettori chimerici con un dominio CD28 avevano anche un AICD inferiore rispetto a 4-1BB in risposta rispettivamente alle cellule tumorali Raji/ROR1 e JeKo-1 (R12: 16,4%/18,4% vs. 2A2 38,1%/39,6%).

[0197] Per determinare se la funzione avanzata osservata con i recettori chimerici ROR1 R12 in cellule T $CD8^+$ si estendesse a cellule T $CD4^+$, abbiamo trasdotto cellule T $CD4^+$ bulk con i recettori chimerici ROR1 2A2 e R12 contenenti il distanziatore corto e il dominio co-stimolatorio CD28. In risposta a cellule tumorali Raji/$ROR1^+$, le cellule T $CD4^+$ che esprimevano l'scFV R12 a elevata affinità producevano livelli più

elevati di IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-4 e IL-10 e subivano una maggiore proliferazione rispetto a cellule T $CD4^+$ che esprimevano 2A2 (Figura 5A, B). Sia la produzione sia la proliferazione di citochine erano superiori nelle cellule T $CD4^+$ rispetto a cellule T $CD8^+$ modificate con gli stessi recettori chimerici ROR1. In sintesi, i nostri dati dimostrano che l'adattamento sia della lunghezza del dominio distanziatore del recettore chimerico extracellulare non di segnalazione sia dell'affinità scFV sono parametri indipendenti che influenzano la funzione delle cellule T con recettore chimerico ROR1.

***Cellule T $D8^+$ modificate con un recettore chimerico ROR1 ad alta affinità hanno un'attività paragonabile a un recettore chimerico CD19 contro CLL primaria* in vitro**

[0198] ROR1 e CD 19 sono entrambi espressi uniformemente su tutta la CLL primaria (Figura 6A), tuttavia si stima che il numero assoluto di molecole ROR1 per cellula tumorale sia 10 volte inferiore a quello del CD19, il quale è stato bersagliato con successo negli studi clinici con cellule T del recettore chimerico CD19. Abbiamo confrontato il riconoscimento della CLL primaria da parte di cellule T

$CD8^+$ esprimenti i recettori chimerici ROR1 R12 e 2A2 ottimizzati e un recettore chimerico CD19 derivato da scFV FMC63. Abbiamo usato T^{CM} $CD8_+$ purificate per la modifica del recettore chimerico per fornire un prodotto cellulare uniforme e ciascun recettore chimerico conteneva un distanziatore corto IgG4-Fc "solo cerniera" e un dominio co-stimolatorio 4-1BB. Abbiamo confermato che il nostro recettore chimerico CD19 (cerniera IgG4) era almeno altrettanto e più efficace nel riconoscere tumori $CD19^+$ rispetto a un recettore chimerico CD19 con distanziatore di cerniera CD8a e dominio co-stimolatorio 4-1BB che viene usato negli studi clinici in corso. (Figura 20). Le cellule T esprimenti recettori chimerici CD19 con 4-1BB e CD3zeta e una cerniera IgG4-Fc modificata mostrano una funzione in vitro e in vivo superiore rispetto alle cellule T esprimenti recettori chimerici CD19 con 4-1BB e CD3zeta e una cerniera alfa CD8. Nella Figura 20D, sono state comparate attività anti-tumorale in vivo delle cellule T esprimenti un recettore chimerico CD19 con cerniera Fc IgG4 (gruppo 1) o cerniera alfa CD8 (gruppo 2) e cellule T esprimenti tEGFR da solo (gruppo 3) in topi NSG inoculati con cellule tumorali Raji esprimenti luciferasi di lucciola (ffluc). I topi sono stati

sottoposti a imaging 17 giorni dopo l'inoculazione del tumore e 10 giorni dopo l'inoculazione delle cellule T. I dati mostrano un carico tumorale maggiore nei topi trattati con cellule T di controllo tEGFR (gruppo 3) o con cellule T con cerniera alfa CD8 con recettore chimerico CD8 (gruppo 2) rispetto ai topi trattati con cellule T con recettore chimerico CD19 IgG4 con cerniera Fc (gruppo 1).

[0199] L'attività citolitica delle cellule T con recettore chimerico ROR1 R12 contro le cellule tumorali primarie di più pazienti con CLL (n = 4) è stata maggiore rispetto alle cellule T modificate con il recettore chimerico ROR1 2A2 di affinità inferiore ed equivalente alla lisi osservata con le cellule T con recettore chimerico CD19 (Figura 6B). L'analisi di citochine multiplex mostrava una produzione quasi equivalente di IFN-γ e TNF-α, ma una produzione inferiore di IL-2 da parte di cellule T $CD8^+$ esprimenti ROR1 R12 rispetto a quelle esprimenti il recettore chimerico CD19 dopo co-coltura con CLL primaria (Figura 6C). Le cellule T con recettore chimerico ROR1 2A2 producevano quantità inferiori di tutte le citochine rispetto alle cellule T con recettore chimerico ROR1 R12 come indicato in precedenza. La produzione di

citochine da parte di tutte le cellule T trasdotte con recettore chimerico dopo la stimolazione con CLL è stata sostanzialmente inferiore rispetto a Raji/ROR1, che a differenza della CLL esprime sia CD80 sia CD86 che possono coinvolgere CD28 espresso sulle cellule T con recettore chimerico (Figura 6A, C).

[0200] Abbiamo osservato una minore proliferazione di cellule T esprimenti il recettore chimerico R12 e ROR1 2A2 rispetto al recettore chimerico CD19 dopo stimolazione con CLL (CD19> R12> 2A2) (Figura 6D). Abbiamo ipotizzato che la proliferazione di cellule T $CD8^+$ con recettore chimerico ROR1 in risposta alla CLL possa essere potenziata in presenza di cellule T $CD4^+$ modificate con recettore chimerico grazie alla loro maggiore secrezione di IL-2 rispetto a T^{CM} $CD8_+$ (Figura 4A; Figura 8A). Per testare questa possibilità, abbiamo effettuato esperimenti *in vitro* di co-coltura in cui T^{CM} $CD4_+$ e CD8 sono stati modificati separatamente con i recettori chimerici ROR1 R12, ROR1 2A2 e CD19 rispettivamente, arricchiti per l'espressione del recettore chimerico e combinati in un rapporto 1:1 per garantire proporzioni equivalenti di cellule T $CD8^+$ e $CD4^+$ modificate con ciascuno dei vettori. Queste cellule sono state marcate con CFSE e stimolate con CLL

primaria. Abbiamo osservato un drammatico aumento della proliferazione di cellule T CD8+ con recettore chimerico ROR1 R12 dopo l'aggiunta di cellule T CD4+ trasdotte con recettore chimerico, ma non di cellule T CD4+ non trasdotte (Figura 8B). In particolare, quando fornite con CD4-helper, abbiamo osservato una proliferazione equivalente di cellule T $CD8^+$ con recettore chimerico ROR1 R12 e CD19 in risposta a CLL, mentre la proliferazione di cellule T $CD8^+$ esprimenti il recettore chimerico ROR1 2A2 di affinità inferiore rimaneva inferiore. Collettivamente, i nostri dati mostrano che il recettore chimerico ROR1 R12 ad alta affinità conferisce una reattività superiore rispetto a 2A2 contro cellule di CLL primaria *in vitro.*

Le cellule T con recettore chimerico ROR1 mediano un'attività anti-tumorale* in vivo *in un modello murino di linfoma a cellule mantellari sistemico

[0201] Rimaneva incerto se la superiore attività *in vitro* delle cellule T modificate con il recettore chimerico R12 ad alta affinità si traducesse in una migliore attività anti-tumorale *in vivo,* e come il bersagliamento di ROR1 potesse essere paragonabile al bersagliamento di CD19. Per rispondere a queste domande, abbiamo inoculato coorti di topi NSG

immunodeficienti con la linea MCL umana JeKo-1/ffluc mediante iniezione nella vena della coda, e sette giorni dopo, quando il tumore è stato disseminato, abbiamo trattato i topi con una singola dose endovenosa di cellule T $CD8^+$ con recettore chimerico ROR1 R12, ROR1 2A2 o CD19. I topi di controllo sono stati trattati con cellule T tEGFR o non trattati. Tutti i recettori chimerici avevano il distanziatore corto ottimale e il dominio co-stimolatorio 4-1BB. I topi NSG/JeKo-1 non trattati hanno sviluppato un linfoma sistemico rapidamente progressivo che necessitava di eutanasia circa 4 settimane dopo l'inoculazione del tumore (Figura 9A-C).

[0202] Abbiamo osservato la regressione del tumore e una migliore sopravvivenza in tutti i topi trattati con cellule T con recettore chimerico ROR1 R12, ROR1 2A2 e CD19. I topi trattati con le cellule T con recettore chimerico ROR1 R12 mostravano una risposta anti-tumorale e una sopravvivenza superiori rispetto ai topi trattati con cellule T con recettore chimerico ROR1 2A2 ($p < 0,01$) e un'attività anti-tumorale paragonabile ai topi trattati con cellule T con recettore chimerico CD19 (Figura 9A-C).

[0203] Abbiamo analizzato la frequenza delle cellule T

con recettore chimerico nel sangue periferico dopo il trasferimento adottivo e rilevato un numero più elevato di cellule T tEGFR$^+$ nei topi trattati con il recettore chimerico ROR1 R12 rispetto al recettore chimerico ROR1 2A2, suggerendo una proliferazione più vigorosa *in vivo* e miglioramento del controllo del tumore. A conferma di ciò, abbiamo somministrato cellule T con recettore chimerico CD19 marcato con CFSE, con recettore chimerico R12 e ROR1 2A2 a coorti di topi NSG recanti JeKo-1/ffluc e abbiamo analizzato la proliferazione di cellule T nel sangue periferico, nel midollo osseo e nella milza 72 ore dopo il trasferimento. Una percentuale più alta delle cellule T con recettore chimerico R12 e CD19 proliferava e subiva un numero maggiore di divisioni cellulari rispetto alle cellule T con recettore chimerico ROR1 2A2 (Figura 9D). Il tumore JeKo-1 alla fine si ripresentava in tutti i topi trattati con cellule T con recettore chimerico ROR1 o CD19 (Figura 9A-C). La recidiva del tumore non era il risultato della selezione delle varianti di perdita di ROR1 o CD19, poiché i tumori ricorrenti erano positivi per entrambe le molecole.

[0204] Per confronto, abbiamo analizzato l'efficacia anti-tumorale delle cellule T con recettore chimerico

CD19 in topi NSG innestati con tumori Raji e abbiamo osservato l'eradicazione completa del tumore, indicando che la recidiva di JeKo-1 riflette la difficoltà di eradicare questo tumore (dati non mostrati). In sintesi, questi dati sono i primi a dimostrare che le cellule T con recettore chimerico ROR1 hanno efficacia anti-tumorale *in vivo,* e suggeriscono che per le neoplasie dei linfociti B, un recettore chimerico ROR1 ottimizzato come R12 possa essere efficace e risparmiare le normali cellule B $CD19^+$ senza espressione di ROR1.

Le cellule T esprimenti il recettore chimerico ROR1 R12 hanno una reattività superiore rispetto a 2A2 contro cellule tumorali epiteliali ROR1$^+$

[0205] ROR1 è stato rilevato su molti tumori epiteliali, sebbene non sia noto se l'espressione di ROR1 sia sufficiente per il riconoscimento da parte delle cellule T con recettore chimerico ROR1. Usando la citometria a flusso, abbiamo confermato l'espressione di ROR1 sulle linee di cancro mammario MDA-MB-231 e 468 e sulle linee di carcinoma a cellule renali FARP, TREP e RWL (Figura 10A). Abbiamo quindi analizzato il riconoscimento del tumore da parte di cellule T $CD8^+$ trasdotte con i recettori chimerici ROR1 R12 con il

distanziatore corto ottimale e il dominio 4-1BB e abbiamo osservato un riconoscimento efficiente di MDA-MB-231, MDA-MB-468, FARP, TREP e RWL (Figura 11A). Abbiamo analizzato la secrezione di citochine e la proliferazione di cellule T modificate con i recettori chimerici R12 e ROR1 2A2 dopo la co-coltura con MDA-MB-231 e abbiamo osservato una maggiore produzione e proliferazione di citochine con il recettore chimerico ROR1 R12 (Figura 11 B, C). Similmente a quello che abbiamo osservato con le malignità a cellule B ROR1$^+$, l'attivazione superiore delle cellule T con recettore chimerico ROR1 R12 dopo la stimolazione con MDA-MB-231 non è stata associata a un aumento di AICD (R12: 9,8% vs. 2A2: 10,9%).

Discussione

[0206] ROR1 ha attirato l'interesse come potenziale bersaglio per l'immunoterapia contro il cancro a causa della sua espressione sulla superficie di molti cancri B-linfoidi ed epiteliali, inclusi sottoinsiemi di cancro polmonare, colorettali e a cellule renali. In precedenza abbiamo dimostrato che CLL e MCL erano specificamente riconosciute dalle cellule T modificate per esprimere un recettore chimerico specifico per ROR1 (Hudecek M, et al. Blood. 2010;116(22):4532-41. Epub

2010/08/13). La progettazione e la funzione dei recettori chimerici ROR1 sono state migliorate modificando il dominio del distanziatore extracellulare e derivando il recettore chimerico da un scFV di affinità più elevata, e dimostrano che le cellule T modificate con recettori chimerici ROR1 progettati hanno attività *in vivo* contro un linfoma a cellule B ROR1^{+} e attività *in vitro* contro un'ampia gamma di tumori epiteliali.

[0207] Abbiamo confrontato la funzione delle cellule T modificate con i recettori chimerici ROR1 derivati dal mAb 2A2 che conteneva le varianti di distanziatore lungo originale IgG4-Fc "Cerniera-CH2-CH3", che abbiamo mostrato consente l'espressione in superficie cellulare di livello elevato, o intermedio troncato "Cerniera-CH3" e corto "solo cerniera". Abbiamo conservato il dominio cerniera di 12 AA nel nostro costrutto distanziatore corto in base a dati precedenti secondo cui era necessario un distanziatore flessibile per separare la scFV dalla membrana delle cellule T e consentire il riconoscimento dell'antigene sulle cellule tumorali (Fitzer-Attas CJ, et al.,Harnessing Syk family tyrosine kinases as signaling domains for chimeric single chain of the variable domain receptors:

optimal design for T cell activation. J Immunol. 1998;160(1):145-54. Epub 1998/04/29.)

[0208] I nostri studi con il recettore chimerico ROR1 2A2 mostrano che la secrezione e la proliferazione delle citochine delle cellule T dopo il riconoscimento delle cellule tumorali sono superiori con i costrutti distanziatori intermedi e corti rispetto al costrutto distanziatore lungo. La colorazione con Ab anti-F(ab) mostrava un'espressione del recettore chimerico equivalente di tutti e tre i recettori, dimostrando che la funzione a cellule T migliorata con il recettore chimerico a distanziatore corto non era dovuta a differenze nella densità del recettore chimerico. Questi dati supportano il principio secondo cui la progettazione dei distanziatori extracellulari deve essere adattata a ciascuna molecola bersaglio ed epitopo.

[0209] L'affinità dello scFV selezionato per la progettazione di un recettore chimerico è un parametro aggiuntivo che potrebbe influenzare il riconoscimento delle cellule T. Abbiamo generato e caratterizzato un pannello di mAb specifici per ROR1 di differenti affinità e selezionato l'mAb R12, che riconosce un epitopo nella regione simil Ig/Frizzled come 2A2. R12

ha una maggiore affinità per la proteina ROR1 grazie a una dissociazione molto più lenta. Il recettore chimerico R12, come il recettore chimerico 2A2, ha conferito un riconoscimento e una funzione ottimali delle cellule T quando progettato con un distanziatore corto extracellulare. Un confronto diretto della proliferazione e della produzione di citochine dopo l'impegno del tumore da parte dei linfociti T modificati con i recettori chimerici 2A2 e R12 ha dimostrato che il recettore chimerico R12 derivato dal mAb ad affinità più elevata era superiore. Eravamo preoccupati che la dissociazione più lenta di R12 da ROR1 potesse prolungare l'attivazione delle cellule T e conferire una maggiore suscettibilità all'AICD. Tuttavia, abbiamo rilevato un tasso inferiore di AICD nelle cellule T modificate con il recettore chimerico ROR1 R12 rispetto a 2A2, dimostrando che l'aumentata affinità di R12 non ha avuto alcun effetto dannoso sulla sopravvivenza delle cellule T nei nostri modelli preclinici.

[0210] ROR1 ha un potenziale vantaggio rispetto a CD19 come bersaglio per CLL e MCL poiché non è espresso sulle normali cellule B memoria e naïve mature. Tuttavia, esiste un numero inferiore di molecole ROR1

sui tumori delle cellule B rispetto a CD19 e non è certo se un recettore chimerico ROR1 ottimizzato possa essere efficace quanto un recettore chimerico CD19 simile in progettazione a quelli usati in clinica. Sfortunatamente, i modelli di xenotrapianto tumorale a cellule B usati in precedenza nei topi NSG per valutare la funzione delle cellule T con recettore chimerico CD19, inclusi Raji, Daudi e Nalm-6, non derivano da CLL o MCL e non esprimono costitutivamente ROR1. Pertanto, per confrontare il bersagliamento di CD19 e ROR1 *in vivo,* abbiamo usato la linea cellulare MCL JeKo-1, che esprime naturalmente sia CD19 sia ROR1 e innesti in topi NSG. Per rendere il nostro modello clinicamente rilevante, abbiamo inoculato cellule di linfoma JeKo-1 per via endovenosa per generare tumori sistemici e topi trattati con prodotti di cellule T di consistenza uniforme una volta che i tumori sono stati instaurati. Abbiamo riscontrato che le cellule T esprimenti il recettore chimerico R12 ad alta affinità conferivano un'attività anti-tumorale equivalente *in vivo* come cellule T con recettore chimerico CD19. Coerentemente con la nostra analisi *in vitro*, il recettore chimerico ROR1 R12 ha anche mediato un'attività superiore *in vivo* rispetto al recettore chimerico ROR1 2A2 ottimale.

Questi risultati devono essere interpretati con cautela poiché i modelli tumorali murini potrebbero non predire l'efficacia della terapia adottiva in ambito clinico. Tuttavia, i risultati suggeriscono che ROR1 merita di essere preso in considerazione come alternativa a CD19 o per fornire un bersaglio aggiuntivo per ridurre al minimo la possibilità che emergano varianti di perdita di CD19.

[0211] ROR1 sembra svolga un ruolo decisivo nella sopravvivenza di alcuni tumori epiteliali. Pertanto, un vantaggio del bersagliamento ROR1 è che un singolo recettore chimerico può essere utile per trattare pazienti con un gran numero di tumori ematopoietici e non ematopoietici.

[0212] I nostri dati mostrano per la prima volta che le cellule T che esprimono un recettore chimerico ROR1 progettato riconoscono in modo efficiente i cancri epiteliali *in vitro.* Secrezione di citochine e proliferazione delle cellule T indotta da cellule di cancro mammario ROR1^{+} erano superiori a quelle indotte dalle cellule leucemiche, nonostante l'assenza del ligando costimolatorio CD80/86. Gli studi riportati nella presente dimostrano che la progettazione del dominio distanziatore extracellulare e l'affinità del

recettore chimerico sono parametri che possono essere modulati per migliorare il riconoscimento di tumori ematologici ed epiteliali ROR1+ *in vitro* e *in vivo* da parte di cellule T modificate con recettore chimerico ROR1. Lo sviluppo di recettori chimerici ROR1 con una reattività tumorale potenziata offre l'opportunità per applicazioni cliniche in una varietà di cancri umani.

Esempio 2

Effetto della lunghezza del dominio distanziatore extracellulare sull'attivazione della lisi delle cellule tumorali con un recettore chimerico specifico per Her2 che riconosce un epitopo situato prossimale alla membrana cellulare tumorale.

[0213] L'effetto della lunghezza del distanziatore CAR sul riconoscimento e l'attivazione del riconoscimento delle cellule tumorali da parte dei linfociti T umani CD8+ che esprimevano un recettore chimerico specifico per HER2 è stato esaminato usando metodi simili a quelli descritti sopra per ROR1. I recettori chimerici specifici per HER2 sono stati costruiti usando segmenti di catena VL e VH di un mAb specifico per HER2 che riconosceva un epitopo prossimale alla membrana su HER2 (Figura 12A) e gli scFV sono stati collegati alla cerniera IgG4/CH2/CH3, cerniera IgG4/CH3, e solo

cerniera IgG4 sui domini distanziatori extracellulari e sul dominio transmembrana CD28, sui domini di segnalazione zeta CD3 e 4-1BB (Figura 12B). Cellule T CD8+ primarie sono state trasdotte con ciascuno dei recettori chimerici HER2 e selezionate per l'espressione del marcatore trasduttore di EGFR (Figura 12D). L'espressione dei recettori chimerici HER2 e la dimensione di ciascun recettore è stata confermata mediante Western Blot (Figura 12C). Le cellule T sono state quindi espanse con mAb anti CD3 e cellule di alimentazione ed esaminate per la loro capacità di riconoscere le cellule tumorali HER2+. Come osservato con il recettore chimerico specifico ROR 1 R11, il recettore chimerico HER2 che conteneva un dominio distanziatore extracellulare lungo conferiva un riconoscimento delle cellule T superiore delle cellule tumorali HER2+ (Figura 12E).

Discussione

[0214] Questo esempio dell'effetto della lunghezza del distanziatore extracellulare sul riconoscimento delle cellule T modificate con recettore chimerico delle cellule tumorali ha usato un recettore chimerico comprendente un scFv costruito da sequenze V_{H+L} dell'mAb chimerico Herceptin. Studi di Cho et al (Nature

421:756, 2003) hanno localizzato la posizione dell'epitopo di Herceptin a una posizione prossimale alla membrana sul dominio extracellulare di HER2 (ERRB2) (Figura 12A). In base alla nostra comprensione della struttura di cerniera IgG4 umana:varianti Fc (Figura 12B), ipotizziamo che una posizione prossimale alla membrana dell'epitopo bersaglio su un antigene di una cellula tumorale extracellulare possa essere meglio riconosciuta dalle cellule T effettrici che esprimono un recettore chimerico codificante un distanziatore lungo. I nostri dati dimostrano un gradiente di attività citolitica da attività vicino al suolo da parte delle cellule T esprimenti un recettore chimerico di Herceptin con distanziatore corto, all'attività intermedia dei linfociti T esprimenti un recettore chimerico con distanziatore di media lunghezza e la lisi massima da parte delle cellule T esprimenti il recettore chimerico con distanziatore lungo. Pertanto, il distanziatore extracellulare ha effetti definitivi sul riconoscimento del tumore da parte delle cellule T e questi dati forniscono ulteriore supporto per la necessità di adattare la progettazione del recettore chimerico in base alla posizione dell'epitopo delle molecole bersaglio espresse dal tumore.

Esempio 3 –

Personalizzazione della lunghezza e della sequenza del distanziatore per un riconoscimento ottimale ed efficacia in vivo di CD19 con cellule T modificate con recettore chimerico.

Materiali e metodi

Soggetti umani

[0215] Campioni di sangue sono stati ottenuti da donatori sani che hanno fornito il consenso informato scritto a partecipare a protocolli di ricerca approvati dall'Institutional Review Board del Fred Hutchinson Cancer Research Center (FHCRC). Cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC) sono state isolate mediante centrifugazione su Ficoll-Hypaque (Sigma, St.Louis, MO) e crioconservate in RPMI, 20% di siero umano e 10% di dimetilsolfossido.

Linee cellulari

[0216] Le linee cellulari K562, Raji, JeKo-1 e 293T sono state ottenute dalla American Type Colture Collection (Manassas, VA) e coltivate come indicato. Un lentivirus codificante il gene ff*luc* a monte di una sequenza T2A ed eGFP è stato prodotto in cellule 293T e usato per trasdurre le cellule tumorali Raji e JeKo-1. Le cellule Raji e JeKo-1 sono state espanse dopo la

trasduzione lentivirale e il sottoinsieme positivo a eGFP è soggette a purificazione per sorting.

Immunofenotipizzazione

[0217] Le PBMC e le linee di cellule T sono state colorate con uno o più dei seguenti anticorpi monoclonali coniugati: CD3, CD4, CD8, CD25, CD45RA, CD45RO, CD62L, CD69 e controlli abbinati per isotipo (BD Biosciences). La colorazione con ioduro di propidio (PI, BD Biosciences) è stata effettuata per la discriminazione delle cellule vive/morte come indicato dal produttore. Le analisi di flusso sono state eseguite su un FACSCanto, le purificazioni per sorting su un FACSAriaII (Becton Dickinson) e i dati analizzati usando il software FlowJo (Treestar).

Costruzione di vettori e preparazione di lentivirus codificanti recettori chimerici CD19

[0218] I recettori chimerici specifici per CD19 sono stati costruiti usando: (1) i segmenti di catena VL e VH dell'mAb FMC63 specifico per CD19 (SEQ ID NO:3), collegati da un peptide linker $(G_4S)_3$ (SEQ ID NO:12) (VL-linker-VH); (2) un dominio distanziatore derivato da IgG4-Fc (Database Uniprot: P01861, (SEQ ID NO:13)) comprendente la porzione cerniera-CH2-CH3 (229 AA, (SEQ ID NO :)) o solo cerniera (12 AA; (SEQ ID NO:4)).

Entrambi i distanziatori contenevano una sostituzione S→P all'interno del dominio Cerniera situato in corrispondenza della posizione 108 della proteina IgG4-Fc nativa; il dominio transmembrana di 27 AA di CD28 umano (Database Uniprot: P10747, (SEQ ID NO:14)); (4) un modulo di segnalazione comprendente (i) il dominio citoplasmatico di 41 AA di CD28 umano con una sostituzione LL→GG situata in corrispondenza della posizione 186-187 della proteina CD28 nativa (SEQ ID NO:14); e/o (ii) il dominio citoplasmatico di 42 AA di 4-1BB umano (Database Uniprot: Q07011, (SEQ ID NO:15)); collegato al (iii) dominio citoplasmatico di 112 AA dell'isoforma 3 di CD3ζ umano (Database Uniprot: P20963, (SEQ ID NO: 16)); la sequenza T2A auto-clivante (SEQ ID NO:8); e (6) una sequenza troncata del recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) (SEQ ID NO:9).

[0219] Le sequenze nucleotidiche ottimizzate per codone codificanti ciascun gene trans sono state sintetizzate (LifeTechnologies, Carlsbad, CA) e clonate nel vettore lentivirale epHIV7 usando i siti di restrizione NheI e Not1. Il vettore lentivirale epHIV7 era stato derivato dal vettore pHIV7 sostituendo il promotore di citomegalovirus di pHIV7 con un promotore EF-1.

[0220] Il lentivirus codificante il recettore chimerico CD19 o tEGFR è stato prodotto in cellule 293T co-trasfettate con il vettore lentivirale e i vettori di impaccamento pCHGP-2, pCMV-Rev2 e pCMV-G usando il reagente di trasfezione Calphos (Clontech). Il terreno è stato cambiato 16 ore dopo la trasfezione e il lentivirus raccolto dopo 24, 48 e 72 ore.

Generazione di linee di cellule T esprimenti i recettori chimerici CD19

[0221] Cellule T $CD8^+$ $CD45RA^-$ $CD45RO^+$ $CD62L^+$ memoria centrali (T_{CM}) soggette a purificazione per sorting di donatori normali sono stati attivati con palline anti-CD3/CD28 (Life Technologies) secondo le istruzioni del produttore e trasdotte con supernatante lentivirale (MOI = 3) integrato con 1 µg/ml di polibrene (Millipore) al giorno 3 dopo l'attivazione mediante centrifugazione a 2.100 rpm per 45 min a 32° C. Le cellule T sono state espanse in RPMI, 10% di siero umano, L-glutammina 2 mM e 1% di penicillina-streptomicina (terreno CTL), integrata con IL-2 umana ricombinante (rh) fino a una concentrazione finale di 50 U/ml ogni 48 ore. Dopo l'espansione, un'aliquota di ciascuna linea di cellule T trasdotte è stata colorata con anticorpo anti-EGFR (recettore del fattore di

crescita epiteliale) coniugato con biotina e palline di streptavidina (Miltenyi) e cellule T tEGFR+ isolate mediante selezione immunomagnetica.

[0222] Il sottoinsieme di cellule T tEGFR+ è stato quindi stimolato con TM EBV-LCL irradiato (8.000 rad) in un rapporto cellula T: LCL di 1:7 ed espanso per 8 giorni in terreno CTL con aggiunta di 50 U/ml di IL-2 rh ogni 48 ore.

Saggi di rilascio di cromo, secrezione di citochine e proliferazione CFSE

[0223] Le cellule bersaglio sono state etichettate con ^{51}Cr (PerkinElmer) durante la notte, lavate e incubate in triplicato a 1-2x 10^3 cellule/pozzetto con cellule T effettrici a vari rapporti tra effettore e bersaglio (E:T). I supernatanti sono stati raccolti per il conteggio γ dopo un'incubazione di 4 ore e la lisi specifica è stata calcolata usando la formula standard. Per l'analisi della secrezione di citochine, le cellule bersaglio ed effettrici sono state piastrate in pozzetti in triplicato con un rapporto E:T di 2: 1 (Raji) o 4: 1 (K562/CDI9 e K562) e INF-γ, TNF-α, IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10 misurati mediante saggio immunologico di citochine multiplex (Luminex) in supernatante rimosso dopo 24 ore di incubazione.

[0224] Per l'analisi della proliferazione, le cellule T sono state etichettate con 0,2 µM di carbossifluoresceina succinimidil estere (CFSE, Invitrogen), lavate e piastrate in pozzetti in triplicato con cellule stimolatrici in un rapporto di 2: 1 (Raji) o 4: 1 (K562/CD19 e K562) in terreno CTL senza citochine esogene. Dopo 72 ore di incubazione, le cellule sono state etichettate con mAb anti-CD3 e ioduro di propidio (PI) per escludere le cellule morte dall'analisi. I campioni sono stati analizzati mediante citometria a flusso e divisione cellulare di cellule T CD3+ vive valutate mediante diluizione CFSE.

Esperimenti in topi NOD/SCID e NOD/SCID/$\gamma c^{-/-}$ (NSG)

[0225] Tutti gli esperimenti sui topi sono stati approvati dal FRCRC Institutional Animal Chimeric Receptor and Use Committee. Topi femmina di età compresa tra 6 e 8 settimane NOD.CBI7-Prkdc^{scid}/J (NOD/SCID) e NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tmlWjl}/SzJ (NSG) sono stati ottenuti dal Jackson Laboratory o allevati internamente (FRCRC. Ai topi sono stati iniettati per via endovenosa (e. v.) 0,5 x 10^6 cellule tumorali Raji-ffluc tramite iniezione nella vena della coda e hanno ricevuto iniezioni di cellule T modificate con recettore chimerico, cellule T di controllo o PBS

tramite iniezione nella vena della coda come indicato.

[0226] Per la rappresentazione per immagini di bioluminescenza, i topi ricevevano iniezioni intraperitoneali (ip) di substrato di luciferina preparato al momento (Caliper Life Sciences, MA) risospeso in PBS (15 µg/g di peso corporeo) e venivano quindi anestetizzati con isoflurano in una camera di induzione. Dopo l'induzione dell'anestesia profonda, i topi sono stati sottoposti a imaging usando uno Xenogen IVIS *In Vivo* Imaging System (Caliper Life Sciences, MA) a 10, 12 e 14 minuti post iniezione di luciferina i.p. con un tempo di acquisizione da 1 secondo a 1 minuto in modalità "small binning" per ottenere immagini insature. L'attività della luciferasi è stata analizzata usando il software Living Image (Caliper Life Sciences, MA) e il flusso di fotoni è stato analizzato all'interno di regioni di interesse che abbracciavano l'intero corpo di ciascun singolo topo.

Analisi statistiche

[0227] Le analisi statistiche sono state effettuate usando Prism Software (GraphPad, CA). Il test t di Student è stato effettuato come test bilaterale con un intervallo di confidenza del 95% e i risultati vengono considerati significativi con un valore p di $p < 0,05$.

L’analisi statistica della sopravvivenza è stata effettuata mediante test dei ranghi logaritmici e i risultati sono stati considerati significativi con un valore p di p< 0,05.

Risultati

Preparazione delle linee cellulari CD8+ T_{CM} policlonali derivate che esprimono recettori chimerici CD19 con distanziatori extracellulari lunghi e corti

[0228] Abbiamo costruito vettori lentivirali individuali codificanti un pannello di geni del recettore chimerico CD 19 ottimizzati per codone per esaminare l’influenza della lunghezza del distanziatore extracellulare sulla funzione in vitro e l’attività anti-tumorale in vivo delle cellule T modificate con recettore chimerico CD 19. Ciascun recettore chimerico era costituito da un frammento variabile a catena singola corrispondente alla sequenza dell’mAb FMC63 specifico per CD19 (scFv: VL-VH), un distanziatore derivato da IgG4-Fc che include il dominio “Cerniera-CH2-CH3” (229 AA, distanziatore lungo) o soltanto il dominio “Cerniera” (12 AA, distanziatore corto) e un modulo di segnalazione di CD3ζ con domini costimolatori CD28 prossimali alla membrana o 4-1 BB, singolarmente o in tandem (Figura 13A). La cassetta di transgene

includeva un EGFR troncato (tEGFR) a valle del gene del recettore chimerico e separato da un elemento T2A clivabile, per fungere da marcatore di trasduzione, selezione e tracciamento in vivo per le cellule T modificate con recettore chimerico.

[0229] Abbiamo isolato una popolazione cellulare di cellule T memoria centrali CD8+ CD45RO+ CD62L+ (T_{CM}) mediante sorting cellulare dal sangue di donatori normali per la trasduzione e l'espansione, grazie alla capacità superiore delle T_{CM} di persistere in vivo dopo il trasferimento adottivo. Le cellule T CD8+ sono state stimolate con palline anti*CD3/28*, trasdotte con ciascuno dei vettori lentivirali ed espanse in coltura per 18 giorni prima di essere usate per esperimenti in vitro e in vivo. (Figura 13B) Efficienze di trasduzione simili sono state ottenute con ciascuno dei vettori lentivirali (media 25%) e le cellule T positive al transgene sono state arricchite per uniformare la purezza mediante selezione immunomagnetica usando un mAb anti-EGFR biotinilato e palline di streptavidina. Dopo l'arricchimento con tEGFR, ciascuna delle linee di cellule T con recettore chimerico CD19 è stata espansa mediante una singola stimolazione con B-LCL CD19+, senza differenze apparenti nella cinetica di crescita

in vitro tra le linee di cellule T esprimenti i vari costrutti di recettore chimerico CD 19. Dopo l'espansione, il marcatore tEGFR è stato espresso a livelli equivalenti sul > 90% delle cellule T trasdotte con ciascuno dei vettori (Figura 13C).

I recettori chimerici CD19 con dominio distanziatore extracellulare lungo e corto conferiscono una reattività anti-tumorale specifica in vitro

[0230] Abbiamo confrontato la funzione effettrice delle linee di cellule derivate da T_{CM} modificate per esprimere recettori chimerici CD19 con frazioni di segnalazione costimolatorie CD28 e 4-1BB e rispettivamente un distanziatore ("corto/CD28"; "corto/4-1BB") o lungo ("lungo/CD28"; "lungo/4-1BB") extracellulare. Le cellule T esprimenti ciascuno dei 4 costrutti di recettore chimerico CD19 hanno conferito un'attività citolitica specifica contro cellule di linfoma Raji e JeKo-1 $CD19^{h}$ e contro cellule K562 che erano state trasfettate stabilmente con CD19, ma non contro cellule K562 $CD19^{-}$ native (Figura 14A). Le analisi quantitative della produzione di citochine in risposta alla stimolazione con cellule tumorali K562/CD19 o Raji mediante saggio multiplex di citochine (Luminex) mostravano la produzione di IFN-γ, TNF-α, IL-

2, IL-4, IL-6 e IL- 10 da cellule T esprimenti ciascuno dei recettori chimerici CD19 (Figura 14B). Le cellule T esprimenti recettori chimerici CD19 con un dominio costimolatore CD28 producevano livelli significativamente più elevati di IFN-γ, TNF-α, IL-2 e IL-10 rispetto ai corrispondenti costrutti con un dominio co-stimolatorio 4-1BB (Figura 14B, C). Vi era una produzione di IFN-γ significativamente più alta e una produzione di IL-4 significativamente inferiore da parte delle cellule T esprimenti il recettore chimerico CD19 “lungo/CD28” rispetto a quelle esprimenti il recettore chimerico “corto/CD28”. Tra i recettori chimerici CD19 con modulo di segnalazione costimolatoria 4-1BB, abbiamo rilevato livelli significativamente più alti di secrezione di IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-4 e IL-10 nelle cellule T esprimenti il costrutto con il dominio distanziatore corto (Figura 14B, C).

[0231] Abbiamo usato la diluizione del colorante CFSE per analizzare la proliferazione delle cellule T modificate con ciascuno dei recettori chimerici CD 19 dopo l’impegno delle cellule tumorali CD19+. Una proliferazione specifica e vigorosa di ciascuna delle linee di cellule T con recettore chimerico CD19 è stata

osservata 72 ore dopo la stimolazione con K562/CD19 o Raji. Il numero medio di divisioni cellulari era più alto per le cellule T con recettore chimerico CD19 con un dominio co-stimolatorio CD28 rispetto a quelle con 4-1BB, coerente con una maggiore produzione di IL-2 da parte delle cellule T esprimenti un recettore chimerico contenente CD28 (Figura 14B-D). Abbiamo anche analizzato la proporzione di cellule T con recettore chimerico che sono state andate incontro a morte cellulare indotta dall'attivazione dopo stimolazione con cellule tumorali K562/CD19 e Raji alla fine delle 72 ore conservando la coltura con CD3+ e PI. Abbiamo rilevato una frequenza maggiore di cellule T $CD3^+$ $CD8^+$ $^{PI+}$ nella linea cellulare del recettore chimerico CD 19 "lungo/4-1 BB", ma sono state osservate poche cellule PI+ con gli altri recettori chimerici CD19. (Figura 14E).

[0232] Questa analisi delle funzioni effettrici in vitro era coerente con studi precedenti che hanno confrontato i domini costimolatori CD28 e 4-1BB e non ha rivelato differenze nella funzione delle cellule T che potranno suggerire che un particolare costrutto di recettore chimerico CD19 di questo pannello potrà essere privo di efficacia anti-tumorale in vivo.

Le cellule T esprimenti recettori chimerici CDI9 con

domini distanziatori extracellulari corti ma non domini distanziatori extracellulari lunghi eradicano i tumori Raji in modelli murini immunodeficienti

[0233] Successivamente abbiamo valutato l'efficacia anti-tumorale in vivo delle cellule T modificate con ciascuno dei recettori chimerici CD19 in topi immunodeficienti (NOD/SCID) innestati con cellule Raji trasfettate con luciferasi di lucciola (Raji-ffluc), il che consente analisi quantitative sequenziali del carico e della distribuzione del tumore usando la bioluminescenza. Topi NOD/SCID inoculati con $0,5x10^6$ cellule Raji-ffluc attraverso iniezione nella vena della coda hanno sviluppato un linfoma disseminato, che se non trattato portava a paralisi degli arti posteriori dopo circa 3,5 settimane, rendendo necessaria l'eutanasia. I topi recanti tumore sono stati trattati con 2 dosi di cellule T $CD8^+$ derivate da T_{CM} modificate con ciascuno dei recettori chimerici CD 19 o con un vettore di controllo tEGFR somministrato al giorno 2 e al giorno 9 dopo l'inoculazione del tumore (Figura 15A).

[0234] Sorprendentemente, soltanto le cellule T modificate per esprimere recettori chimerici CD19 con dominio distanziatore extracellulare corto

(“corto/CD28” e “corto/4-1BB”) eradicavano i tumori Raji in questo modello, mentre i topi trattati con cellule T esprimenti recettori chimerici CD19 con distanziatore lungo (“lungo/CD28” e “10ng/4-1BB”) sviluppavano linfoma sistemico e paralisi degli arti posteriori con cinetica quasi identica a quella dei topi non trattati o dei topi trattati con cellule T tEGFR^{+} di controllo (Figura 15B, C). La notevole differenza nell’attività anti-tumorale tra i recettori chimerici CD19 con domini distanziatori corti e lunghi era altamente significativa e riproducibile in molteplici esperimenti con linee di cellule T con recettore chimerico generate da 3 differenti donatori normali.

[0235] Il modello di linfoma NOD/SCID può non essere ottimale per prevedere l’attività anti-tumorale in un contesto clinico a causa del breve intervallo tra l’inoculazione del tumore e la somministrazione di cellule T e la maggiore resistenza all’attecchimento delle cellule umane rispetto a più ceppi di topi immunodeficienti come NOD/SCID/$\gamma c^{-/-}$ (NSG). Pertanto, abbiamo valutato l’attività anti-tumorale della terapia adottiva in un modello clinicamente più rilevante in cui il linfoma Raji-ffluc è stato instaurato in topi

NSG e le cellule T con recettore chimerico CD19 sono state somministrate dopo 7 giorni quando il tumore era facilmente rilevabile nel midollo osseo mediante rappresentazione per immagini di bioluminescenza (Figura 16A). Abbiamo effettuato esperimenti di titolazione della dose iniziale per determinare la dose minima di cellule T trasdotte con il recettore chimerico CD19 “corto/4-1BB” necessario per l’eradicazione di tumori Raji instaurati. Una singola dose di $2,5x10^6$ cellule T esprimenti il recettore chimerico CD19 “corto/4-1BB” hanno promosso la regressione completa di tumori Raji instaurati e hanno portato a una sopravvivenza libera da tumore a lungo termine nel 100% dei topi (Figura 16B, C). Al livello di dose di $2,5x10^6$, le cellule T sono state facilmente rilevate nel sangue periferico di topi NSG per almeno 3 settimane dopo il trasferimento adottivo e l’eradicazione del tumore. Pertanto, questo modello ha consentito studi comparativi sia sull’attività anti-tumorale sia sulla persistenza delle cellule T modificate con ciascuno dei recettori chimerici CD19 nel nostro pannello (Figura 16D).

[0236] Abbiamo quindi trattato coorti di topi NSG che erano stati trapiantati con linfoma Raji con PBS da

solo, con una singola dose di $2,5x10^6$ cellule T esprimenti ciascuno dei recettori chimerici CD19 o con cellule T modificate con un vettore di controllo codificante tEGFR (Figura 17A). In questo modello di linfoma consolidato, le cellule T esprimenti recettori chimerici CD19 con un dominio distanziatore corto extracellulare e domini costimolatori 4-1BB o CD28 (“corto/CD28” e “corto/4-1BB”) hanno mediato la regressione completa del tumore nell’arco di 7-10 giorni e tutti i topi sono sopravvissuti senza tumore per > 56 giorni. Al contrario, i topi trattati con linfociti T modificati per esprimere i recettori chimerici CD19 con un dominio distanziatore lungo (“lungo/CD28” e “lungo/4-1BB”) mostravano progressione del tumore e dovevano essere sacrificati in un momento simile ai topi che ricevevano cellule T tEGFR di controllo (Figura 17B, C). La mancanza di attività anti-tumorale in vivo dei costrutti di recettore chimerico con distanziatori lunghi era inaspettata data la capacità delle cellule T esprimenti questi costrutti di lisare le cellule tumorali in vitro e la maggiore produzione e proliferazione di IL-2 dopo l’impegno delle cellule T esprimenti il 'recettore chimerico CD19 lungo/CD28' rispetto ai costrutti 4-1BB.

[0237] Per fornire informazioni in base alla mancanza di efficacia, abbiamo effettuato una citometria a flusso sequenziale su campioni di sangue periferico di topi a intervalli dopo l'infusione di cellule T. Tutti i topi trattati con cellule T esprimenti i recettori chimerici CD19 "corto/CD28" e "corto/4-1BB" avevano livelli significativamente più alti di cellule T trasferite nel sangue in tutti i momenti dopo il trasferimento adottivo, rispetto ai topi trattati con cellule T che esprimevano i corrispondenti recettori chimerici CD19 con un distanziatore extracellulare lungo ($p < 0,01$) (Figura 17D). Non abbiamo osservato differenze significative nella persistenza delle cellule T nel sangue periferico dei topi che avevano ricevuto cellule T che esprimevano recettori chimerici CD19 con domini co-stimolatori CD28 o 4-1BB e domini distanziatori corti (Figura 17D).

L'efficacia anti-tumorale in vivo dei recettori chimerici CD19 con distanziatori lunghi non viene migliorata aumentando la dose di cellule T o fornendo un dominio co-stimolatorio aggiuntivo

[0238] La mancanza di efficacia anti-tumorale in vivo e il livello inferiore di cellule T persistenti del recettore chimerico nei topi trattati con cellule T

modificate con recettori chimerici CD19 con domini distanziatori lunghi suggerivano che l'efficacia potesse essere migliorata aumentando la dose di cellule T con recettore chimerico o includendo entrambi i domini CD28 e 4-IBB nel recettore chimerico per aumentare la segnalazione costimolatoria. Per valutare questa possibilità abbiamo modificato T_{CM} CD8+ con vettori del recettore chimerico CD19 "lungo/CD28", "corto CD28" e "lungo/CD28_4-1BB" e confermato che il recettore chimerico lungo CD19/CD28_4-1BB conferisce lisi specifica e produzione di citochine in vitro dopo il riconoscimento di cellule bersaglio CD19+ (Figura 18A-C). Coerentemente con studi precedenti sui recettori chimerici CD19, il livello di produzione e proliferazione di citochine in vitro nelle cellule T esprimenti il recettore chimerico CDI9 CD28_ 4-IBB' era inferiore rispetto al costrutto identico con il solo CD28 e superiore alle cellule T esprimenti il recettore chimerico CD19 lungo 4-IBB' (Figura 18B, C).

[0239] Gruppi di topi NSG con tumori Raji consolidati sono stati quindi trattati con una dose elevata di cellule T ($10x10^6$) cellule T esprimenti il recettore chimerico CD19 "lungo/CD28", il recettore chimerico CDI9 "lungo/CD28_ 4-IBB", il recettore chimerico CD19

“corto/CD28” e solo tEGFR. Il carico tumorale è stato misurato mediante rappresentazione per immagini di bioluminescenza e analisi citometriche a flusso seriale di campioni di sangue periferico effettuate per determinare la frequenza delle cellule T trasferite. Coerentemente con i risultati dei nostri precedenti esperimenti usando dosi molto più basse di cellule T, i tumori Raji sono stati completamente eradicati nei topi trattati con cellule T esprimenti il recettore chimerico CD19 “corto/CD28”. Tuttavia, anche con una dose di cellule T 4 volte superiore, il trattamento con cellule T esprimenti il recettore chimerico CD19 “lungo/CD28’ o il recettore chimerico CD19 “lungo/CD28_4-1BB” non forniva un effetto anti-tumorale distinguibile (Figura 18D, E).

[0240] Pertanto, l’aumento della dose di cellule T con recettore chimerico e l’aggiunta di un dominio co-stimolatorio 4-1BB ai recettori chimerici CD19 non sono riusciti a superare l’impatto negativo del dominio distanziatore più lungo sull’attività anti-tumorale in vivo. Pertanto, in questo modello, la reattività anti-tumorale dei recettori chimerici CD19 è dettata in larga misura dalla lunghezza del dominio distanziatore extracellulare, e non dai moduli di segnalazione

costimolatori intracellulari.

Le cellule T modificate con recettori chimerici CD19 che possiedono lunghi distanziatori extracellulari subiscono la morte cellulare indotta dall'attivazione in vivo

[0241] Abbiamo cercato di determinare i potenziali meccanismi alla base dell'attività anti-tumorale inferiore in vivo delle cellule T che esprimono i recettori chimerici CD19 con domini distanziatori lunghi. Poiché nel sangue erano presenti un numero inferiore di cellule T trasferite modificate per esprimere recettori chimerici CD19 con lunghi domini distanziatori, abbiamo considerato la possibilità che le cellule T non fossero attivate in modo efficiente dalle cellule tumorali in vivo o, al contrario, che subissero morte delle cellule T indotta dall'attivazione in vivo. Pertanto, abbiamo etichettato le cellule T di controllo modificate e corrispondenti del recettore chimerico CD19 con CFSE e abbiamo somministrato queste cellule T a topi NSG/Raji recanti tumore per esaminare l'attivazione, la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule T modificate con ciascuno dei costrutti di recettore chimerico CD19 in corrispondenza dei siti tumorali in vivo (Figura 19A).

Al termine della loro espansione in vitro e immediatamente prima dell'etichettatura CFSE e dell'infusione in topi NSG portatori di tumori Raji instaurati, le cellule T trasdotte con ciascuno dei recettori chimerici CD19 esprimevano bassi livelli dei marcatori di attivazione CD69 e CD25 (Figura 19B).

[0242] Il midollo osseo è stato ottenuto da sottogruppi di topi 24 e 72 ore dopo l'infusione di cellule T per esaminare la frequenza, l'attivazione e la proliferazione delle cellule T trasferite. A 24 ore, le cellule tumorali (CD45+ CD3-) erano presenti nel midollo osseo in tutti i gruppi di trattamento e un'ampia frazione di cellule T con recettore chimerico, ma non le cellule T di controllo, presentava CD69 e CD25 sovraregolati. Non vi era diluizione misurabile di CFSE nelle cellule T con recettore chimerico trasferito. (Figura 19C) Sia CD69 sia CD25 sono stati espressi in una percentuale maggiore di cellule T modificate con recettori chimerici CD19 con "distanziatori lunghi", suggerendo che queste cellule potevano aver ricevuto uno stimolo più forte rispetto alle cellule T con recettori chimerici CD19 con "distanziatori corti" (Figura C). Nonostante l'evidenza dell'attivazione delle cellule T a 24 ore,

nel midollo osseo dei topi trattati con cellule T modificate con i costrutti “distanziatore lungo” CD28 e 4-IBB era presente un numero significativamente inferiore di cellule T con recettore chimerico rispetto a quelli modificati con costrutti “distanziatore corto” 4-IBB e CD28 o con il vettore tEGFR di controllo (Figura 19C, E).

[0243] 72 ore dopo il trasferimento delle cellule T, le cellule T esprimenti i recettori chimerici CD19 “corto/CD28” e “corto/4-1BB” erano aumentati di da 3 a > 10 volte di frequenza nel midollo osseo e nella milza e aveva subito svariati divisioni cellulari (Figura 19D, E). Le cellule T di controllo tEGFR+ sono rimaste presenti nel midollo osseo e nella milza a 72 ore a un livello simile a quello osservato a 24 ore e non si sono divise come misurato dalla diluizione CFSE. Al contrario, il numero di cellule T esprimenti i recettori chimerici CD19 “lungo/CD28” e “lungo/4-IBB” non aumentava nel midollo osseo e nella milza. (Figura 19D, E) Coerentemente con un numero di cellule più basso, l’analisi della colorazione CFSE nelle cellule T con recettore chimerico CD19 “lungo/CD28” e “lungo/4-IBB” vitale ha dimostrato che queste cellule avevano subito un numero molto inferiore di divisioni cellulari

rispetto alle cellule T con recettore chimerico CD19 “corto/CD28” e “corto/4-IBB”. (Figura 19D) Quando i dati di flusso sono stati analizzati per includere le cellule T PI+, abbiamo rilevato una frequenza molto più alta di cellule T PI+ CD3+ nel midollo osseo e nella milza di topi che ricevevano cellule T con recettore chimerico CD19 con domini “distanziatori lunghi”, dimostrando che una percentuale significativa di cellule T, nonostante fosse stata attivata dal tumore in vivo, aveva subito morte cellulare (Figura 19F). Coerentemente con la rappresentazione per immagini di bioluminescenza, le cellule tumorali Raji CD45+ CD3- erano presenti in numero maggiore nel midollo osseo di topi trattati con cellule T esprimenti recettori chimerici CD19 con domini distanziatori lunghi o esprimenti soltanto tEGFR rispetto ai topi trattati con recettori chimerici CD19 con domini distanziatori corti (Figura 19D, E, G).

[0244] Collettivamente, i dati forniscono la prova che i recettori chimerici CD19 con dominio distanziatore extracellulare lungo, nonostante la mediazione della funzione effettrice equivalente o superiore in vitro e il riconoscimento del tumore in vivo, inducono un alto livello di morte cellulare indotta dall’attivazione in

vivo e non riescono a eradicare il linfoma instaurato.

Discussione

[0245] I recettori chimerici sono recettori artificiali che includono uno scFv extracellulare legante l'antigene, un dominio distanziatore che fornisce la separazione dell'scFv dalla membrana cellulare e un modulo di segnalazione intracellulare che media l'attivazione delle cellule T. I recettori chimerici che contengono un scFv derivato dall'mAb FMC63 specifico per CD19 studiato nella presente, sono passati alla sperimentazione in studi clinici su pazienti con tumori maligni delle cellule B. L'attività anti-tumorale e la persistenza delle cellule T variavano sostanzialmente in differenti sperimentazioni. Ciascuno di questi studi clinici differiva in variabili potenzialmente critiche, inclusi differenti vettori di trasferimento genico, metodologie di colture cellulari e regimi di condizionamento prima del trasferimento delle cellule T con recettore chimerico CD 19.

[0246] Abbiamo esaminato la possibilità che il dominio distanziatore extracellulare dei recettori chimerici CD19 possa essere un importante determinante dell'attività anti-tumorale in vivo, indipendentemente

dalla segnalazione costimolatoria fornita dal recettore chimerico. Abbiamo derivato domini distanziatori da IgG4-Fc, che consente livelli elevati di espressione in superficie cellulare del recettore chimerico ed è meno probabile che provochi il riconoscimento da parte delle cellule immunitarie innate rispetto ad altri isotipi IgG. Abbiamo usato IgG4 “Cerniera-CH2-CH3” nella progettazione dei costrutti distanziatori lunghi (229 AA) e il dominio IgG4 “cerniera” nei nostri recettori chimerici con distanziatore corto (12 AA). Per confrontare i singoli costrutti di recettore chimerico, abbiamo usato cellule T positive a $CD8^+$ derivate da T_{CM} con recettore chimerico purificate (>90%) per rimuovere le differenze nella composizione cellulare e nella frequenza di trasduzione come potenziale sorgente di bias nell’analisi della funzione in vitro e in vivo. T^{CM} $CD8_+$ mostravano di avere tratti superiori per l’immunoterapia adottiva, rispetto ad altri sottogruppi di cellule T più diffusi nel sangue che persistono male e sono inefficaci nella terapia del tumore. Le cellule T con recettore chimerico CD19 sono state generate usando un protocollo di coltura standardizzato simile a quello usato per derivare le cellule T con recettore chimerico per gli studi clinici. I nostri dati mostrano

che i recettori chimerici CD 19 con un distanziatore corto IgG4 'Cerniera' conferivano una potente reattività anti-tumorale in vitro e in vivo, mentre i corrispondenti recettori chimerici CD19 con un distanziatore lungo di IgG4 'Cerniera-CH2-CH3', nonostante equivalenti o reattività superiore in vitro, non sono riusciti a conferire significativi effetti antitumorali nei modelli murini di linfoma. Sorprendentemente, la lunghezza del dominio distanziatore si è dimostrata un elemento decisivo per l'attività anti-tumorale in vivo e la mancanza di efficacia del recettore chimerico "distanziatore lungo" non può essere superata aumentando la dose di cellule T.

[0247] Abbiamo anche osservato importanti differenze nella secrezione e proliferazione di citochine in vitro tra le cellule T esprimenti recettori chimerici CD19 contenenti domini costimolatori CD28 e 4-1BB, CD28 potenziando la secrezione di IFN-γ, IL-2 e TNF-α rispetto a 4-1BB. Anche i recettori chimerici CD19 che possedevano un CD28_4-1BB tandem producevano livelli più elevati di queste citochine rispetto ai recettori chimerici codificanti soltanto 4-1BB. Tuttavia, i nostri dati mostrano che queste differenze nella

funzione in vitro non erano predittive dell'efficacia anti-tumorale in vivo, poiché i recettori chimerici CD 19 con dominio co-stimolatorio CD28 o 4-1BB e un distanziatore corto erano altrettanto efficaci nell'eradicazione dei tumori Raji avanzati in topi NSG. Al contrario, i recettori chimerici CD19 con lunghezza del distanziatore subottimale e CD28, 4-1BB o entrambi i domini costimolatori, nonostante conferissero una funzione in vitro simile all'identico costrutto di recettore chimerico con un dominio distanziatore corto, erano privi di una significativa attività anti-tumorale in vivo, dimostrando il contributo della lunghezza del distanziatore alla funzione in vivo delle cellule T con recettore chimerico.

[0248] I nostri studi forniscono informazioni sul meccanismo responsabile della mancanza di efficacia in vivo dei recettori chimerici CD19 con domini distanziatori lunghi. Le cellule T esprimenti i recettori chimerici CD19 con domini distanziatori sia lunghi sia corti potevano essere rilevate nel midollo osseo e nella milza dopo il trasferimento adottivo in topi NSG recanti linfoma Raji instaurato, e la maggior parte veniva attivata come dimostrato dalla sovraregolazione di CD25 e CD69. Tuttavia, le cellule T

modificate per esprimere un recettore chimerico CD19 con un dominio distanziatore lungo mostravano un forte calo del numero di cellule, in contrasto con la marcata espansione in vivo delle cellule T esprimenti recettori chimerici CD19 con un dominio distanziatore corto. Il declino del numero di cellule T era una conseguenza di livelli molto più elevati di morte cellulare nelle prime 72 ore dopo il trasferimento adottivo rispetto ai linfociti T con domini distanziatori corti e ai linfociti T di controllo che non esprimevano un recettore chimerico CD19. Collettivamente, questi dati indicano che il riconoscimento delle cellule tumorali in vivo provocava la morte delle cellule T esprimenti i recettori chimerici CD19 con domini distanziatori lunghi. Un meccanismo simile può spiegare la breve durata e i bassi livelli di persistenza delle cellule T negli studi clinici che hanno usato i recettori chimerici CD19 con distanziatore lungo (14).

[0249] Gli studi riportati nella presente sono i primi a dimostrare che i domini distanziatori dei recettori chimerici CD19 privi di proprietà di segnalazione intrinseche hanno effetti drammatici sull'attività anti-tumorale in vivo indipendentemente dalla segnalazione costimolatoria e identificano l'importanza

di analizzare la composizione ottimale di questa regione nella progettazione di recettori chimerici per applicazioni cliniche.

Tabella 1

Sequenza di anti-recettore CD19 chimerico con distanziatore corto

GMCSFRss-CD19scFv-IgG4hinge-CD28tm-41BB-Zeta-T2A-EGFRt

Atgctgctgctggtgaccagcctgctgctgtgcgagctgccccaccccgcctttctgctgatcccc (GMCSFRss) (SEQ ID NO:2)

Gacatccagatgacccagaccacctccagcctgagcgccagcctgggcgaccgggtgaccatcagctgccggg ccagccaggacatcagcaagtacctgaactggtatcagcagaagcccgacggcaccgtcaagctgctgatctac cacaccagccggctgcacagcggcgtgcccagccggtttagcggcagcggctccggcaccgactacagcctgac catctccaacctggaacaggaagatatcgccacctacttttgccagcagggcaacacactgccctacacctttggc ggcggaacaaagctggaaatcaccggcagcacctccggcagcggcaagcctggcagcggcgagggcagcacc aagggcgaggtgaagctgcaggaaagcggccctggcctggtggcccccagccagagcctgagcgtgacctgca ccgtgagcggcgtgagcctgcccgactacggcgtgagctggatccggcagccccccaggaagggcctggaatg gctgggcgtgatctggggcagcgagaccacctactacaacagcgccctgaagagccggctgaccatcatcaag gacaacagcaagagccaggtgttcctgaagatgaacagcctgcagaccgacgacaccgccatctactactgcgc caagcactactactacggcggcagctacgccatggactactggggccagggcaccagcgtgaccgtgagcagc (CD19scFv) (SEQ ID NO:3)

Gaatctaagtacggaccgccctgcccccttgccct (IgG4hinge) (SEQ ID NO:4)

Atgttctgggtgctggtggtggtcggaggcgtgctggcctgctacagcctgctggtcaccgtggccttcatcatctt ttgggtg (CD28tm-)(SEQ ID NO:5)

Aaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagagg aagatggctgtagctgccgatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaactg (41BB) (SEQ ID NO:6)

Cgggtgaagttcagcagaagcgccgacgcccctgcctaccagcagggccagaatcagctgtacaacgagctga acctgggcagaagggaagagtacgacgtcctggataagcggagaggccgggaccctgagatgggcggcaagc ctcggcggaagaacccccaggaaggcctgtataacgaactgcagaaagacaagatggccgaggcctacagcg agatcggcatgaagggcgagcggaggcggggcaagggccacgacggcctgtatcagggcctgtccaccgcca ccaaggatacctacgacgccctgcacatgcaggccctgccccaagg (CD3Zeta)- (SEQ ID NO:7)

Ctcgagggcggcggagagggcagaggaagtcttctaacatgcggtgacgtggaggagaatcccggccctagg (T2A) (SEQ ID NO:8)

Atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacacccagcattcctcctgatcccacgcaaagtgtg taacggaataggtattggtgaatttaaagactcactctccataaatgctacgaatattaaacacttcaaaaactgc acctccatcagtggcgatctccacatcctgccggtggcatttaggggtgactccttcacacatactcctcctctggat ccacaggaactggatattctgaaaaccgtaaaggaaatcacagggtttttgctgattcaggcttggcctgaaaac aggacggacctccatgcctttgagaacctagaaatcatacgcggcaggaccaagcaacatggtcagttttctctt gcagtcgtcagcctgaacataacatccttgggattacgctccctcaaggagataagtgatggagatgtgataattt caggaaacaaaaatttgtgctatgcaaatacaataaactggaaaaaactgtttgggacctccggtcagaaaacc aaaattataagcaacagaggtgaaaacagctgcaaggccacaggccaggtctgccatgccttgtgctcccccga

gggctgctggggcccggagcccagggactgcgtctcttgccggaatgtcagccgaggcagggaatgcgtggac
aagtgcaaccttctggagggtgagccaagggagtttgtggagaactctgagtgcatacagtgccacccagagtg
cctgcctcaggccatgaacatcacctgcacaggacggggaccagacaactgtatccagtgtgcccactacattga
cggcccccactgcgtcaagacctgcccggcaggagtcatgggagaaaacaacaccctggtctggaagtacgca
gacgccggccatgtgtgccacctgtgccatccaaactgcacctacggatgcactgggccaggtcttgaaggctgt
ccaacgaatgggcctaagatcccgtccatcgccactgggatggtgggggccctcctcttgctgctggtggtggccc
tggggatcggcctcttcatg*tga* (EGFRt) (SEQ ID NO:9)

Tabella 2

GMCSFRss

DNA: *ATG*CTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCCCACCCCGCC
AA: M L L L V T S L L L C E L P H P A

CD19scFv

DNA: TTTCTGCTGATCCCC:GACATCCAGATGACCCAGACCACCTCCAGCCTGAGC
AA: F L L I P D I Q M T Q T T S S L S

DNA: GCCAGCCTGGGCGACCGGGTGACCATCAGCTGCCGGGCCAGCCAGGACATC
AA: A S L G D R V T I S C R A S Q D I

DNA: AGCAAGTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGACGGCACCGTCAAGCTG
AA: S K Y L N W Y Q Q K P D G T V K L

DNA: CTGATCTACCACACCAGCCGGCTGCACAGCGGCGTGCCCAGCCGGTTTAGC
AA: L I Y H T S R L H S G V P S R F S

DNA: GGCAGCGGCTCCGGCACCGACTACAGCCTGACCATCTCCAACCTGGAACAG
AA: G S G S G T D Y S L T I S N L E Q

DNA: GAAGATATCGCCACCTACTTTTGCCAGCAGGGCAACACACTGCCCTACACC
AA: E D I A T Y F C Q Q G N T L P Y T

DNA: TTTGGCGGCGGAACAAAGCTGGAAATCACCGGCAGCACCTCCGGCAGCGGC
AA: F G G G T K L E I T G S T S G S G

DNA: AAGCCTGGCAGCGGCGAGGGCAGCACCAAGGGCGAGGTGAAGCTGCAGGAA
AA: K P G S G E G S T K G E V K L Q E

DNA: AGCGGCCCTGGCCTGGTGGCCCCCAGCCAGAGCCTGAGCGTGACCTGCACC
AA: S G P G L V A P S Q S L S V T C T

DNA: GTGAGCGGCGTGAGCCTGCCCGACTACGGCGTGAGCTGGATCCGGCAGCCC
AA: V S G V S L P D Y G V S W I R Q P

DNA: CCCAGGAAGGGCCTGGAATGGCTGGGCGTGATCTGGGGCAGCGAGACCACC
AA: P R K G L E W L G V I W G S E T T

DNA: TACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACAGC
AA: Y Y N S A L K S R L T I I K D N S

DNA: AAGAGCCAGGTGTTCCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCC
AA: K S Q V F L K M N S L Q T D D T A

DNA: ATCTACTACTGCGCCAAGCACTACTACTACGGCGGCAGCTACGCCATGGAC
AA: I Y Y C A K H Y Y Y G G S Y A M D

IgG4hinge

DNA: TACTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACCGTGAGCAGC:GAGAGCAAGTACGGA
AA: Y W G Q G T S V T V S S E S K Y G

CD28tm

DNA: CCGCCCTGCCCCCCTTGCCCT:ATGTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTCGGAGGC
AA: P P C P P C P M F W V L V V V G G

DNA: GTGCTGGCCTGCTACAGCCTGCTGGTCACCGTGGCCTTCATCATCTTTTGG
AA: V L A C Y S L L V T V A F I I F W

41BB

DNA: GTG:AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATG
AA: V K R G R K K L L Y I F K Q P F M

DNA: AGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCA
AA: R P V Q T T Q E E D G C S C R F P

CD3**Zeta**

DNA: GAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGCGGGTGAAG:TTCAGCAGAAGCGCC
AA: E E E E G G C E L R V K F S R S A

DNA: GACGCCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAATCAGCTGTACAACGAGCTGAAC
AA: D A P A Y Q Q G Q N Q L Y N E L N

DNA: CTGGGCAGAAGGGAAGAGTACGACGTCCTGGATAAGCGGAGAGGCCGGGAC
AA: L G R R E E Y D V L D K R R G R D

DNA: CCTGAGATGGGCGGCAAGCCTCGGCGGAAGAACCCCCAGGAAGGCCTGTAT
AA: P E M G G K P R R K N P Q E G L Y

DNA: AACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATG
AA: N E L Q K D K M A E A Y S E I G M

DNA: AAGGGCGAGCGGAGGCGGGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTATCAGGGCCTG
AA: K G E R R R G K G H D G L Y Q G L

DNA: TCCACCGCCACCAAGGATACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCC
AA: S T A T K D T Y D A L H M Q A L P

T2A

DNA: CCAAGG:CTCGAGGGCGGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGT
AA: P R L E G G G E G R G S L L T C G

EGFRt

DNA: GACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGG:**ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTT**
AA: D V E E N P G P R M L L L V T S L

DNA: **CTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCCTCCTGATCCCACGCAAAGTG**
AA: L L C E L P H P A F L L I P R K V

DNA: **TGTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACTCACTCTCCATAAATGCT**
AA: C N G I G I G E F K D S L S I N A

DNA: **ACGAATATTAAACACTTCAAAAACTGCACCTCCATCAGTGGCGATCTCCAC**
AA: T N I K H F K N C T S I S G D L H

DNA: **ATCCTGCCGGTGGCATTTAGGGGTGACTCCTTCACACATACTCCTCCTCTG**
AA: I L P V A F R G D S F T H T P P L

DNA: **GATCCACAGGAACTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGGGTTT**
AA: D P Q E L D I L K T V K E I T G F

DNA: **TTGCTGATTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCCTTTGAG**
AA: L L I Q A W P E N R T D L H A F E

DNA: **AACCTAGAAATCATACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTT**
AA: N L E I I R G R T K Q H G Q F S L

DNA: **GCAGTCGTCAGCCTGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAG**
AA: A V V S L N I T S L G L R S L K E

DNA: **ATAAGTGATGGAGATGTGATAATTTCAGGAAACAAAAATTTGTGCTATGCA**
AA: I S D G D V I I S G N K N L C Y A

DNA: **AATACAATAAACTGGAAAAAACTGTTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACCAAA**
AA: N T I N W K K L F G T S G Q K T K

DNA: **ATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGCTGCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGC**
AA: I I S N R G E N S C K A T G Q V C

DNA: **CATGCCTTGTGCTCCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCGGAGCCCAGGGACTGC**
AA: H A L C S P E G C W G P E P R D C

DNA: **GTCTCTTGCCGGAATGTCAGCCGAGGCAGGGAATGCGTGGACAAGTGCAAC**
AA: V S C R N V S R G R E C V D K C N

DNA: **CTTCTGGAGGGTGAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGTGCATACAG**
AA: L L E G E P R E F V E N S E C I Q

DNA: **TGCCACCCAGAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGACGG**
AA: C H P E C L P Q A M N I T C T G R

DNA: **GGACCAGACAACTGTATCCAGTGTGCCCACTACATTGACGGCCCCCACTGC**
AA: G P D N C I Q C A H Y I D G P H C

DNA: **GTCAAGACCTGCCCGGCAGGAGTCATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCTGG**
AA: V K T C P A G V M G E N N T L V W

DNA: **AAGTACGCAGACGCCGGCCATGTGTGCCACCTGTGCCATCCAAACTGCACC**
AA: K Y A D A G H V C H L C H P N C T

DNA: **TACGGATGCACTGGGCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCAACGAATGGGCCTAAG**
AA: Y G C T G P G L E G C P T N G P K

DNA: **ATCCCGTCCATCGCCACTGGGATGGTGGGGGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTG**
AA: I P S I A T G M V G A L L L L L V

DNA: **GTGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCATG*TGA*** (SEQ ID NO:10)
AA: V A L G I G L F M * (SEQ ID NO:11)

Tabella 3

ZXR-014 Sequenze nucleotidiche e di acido nucleico (mappa delle sezioni)

GMCSFRss: nt2084-2149

CD19scFv: nt2150-2884

Igg4Hinge: nt2885-2920

CD28tm: nt2921-3004

41BB: nt3005-3130

Zeta: nt3131-3466

T2A: nt3467-3538

EGFRt: nt3539-4612

Primer per il sequenziamento:

Nome oligo	Sequenza	Regione
oJ02649	ATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGT	pre-U5(SEQ ID NO:22)
oJ02648	CCGTACCTTTAAGACCAATGACTTAC	delU3(SEQ ID NO:23)
oJ02650	TTGAGAGTTTTCGCCCCG	mid-Ampr(SEQ ID NO:24)
oJ02651	AATAGACAGATCGCTGAGATAGGT	post-Ampr(SEQ ID NO:25)
oJ02652	CAGGTATCCGGTAAGCGG	CoE1 ori(SEQ ID NO:26)
oJ02653	CGACCAGCAACCATAGTCC	SV40(SEQ ID NO:27)
oJ02654	TAGCGGTTTGACTCACGG	CMV(SEQ ID NO:28)
oJ02655	GCAGGGAGCTAGAACGATTC	psi(SEQ ID NO:29)
oJ02656	ATTGTCTGGTATAGTGCAGCAG	RRE(SEQ ID NO:30)
oJ02657	TCGCAACGGGTTTGCC	EF1p(SEQ ID NO:31)
oJ02658	AGGAAGATATCGCCACCTACT	CD19Rop(SEQ ID NO:32)
oJ02601	CGGGTGAAGTTCAGCAGAAG	Zeta(SEQ ID NO:33)
oJ02735	ACTGTGTTTGCTGACGCAAC	WPRE(SEQ ID NO:34)
oJ02715	ATGCTTCTCCTGGTGACAAG	EGFRt(SEQ ID NO:35)

Tabella 4 Uniprot P0861 IgG4-Fc(SEQ ID NO: 13)

```
    10         20         30         40         50         60
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS

        70         80         90        100        110        120
GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPSCP APEFLGGPSV

       130        140        150        160        170        180
FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY

       190        200        210        220        230        240
RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK

       250        260        270        280        290        300
NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG

       310        320
NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK
```

1-98 CH1

99-110 Cerniera

111-220 CH2

221-327 CH3

Posizione 108 S→P

Tabella 5 Uniprot P10747 CD28 (SEQ ID NO: 14)

```
10         20         30         40         50         60
MLRLLLALNL FPSIQVTGNK ILVKQSPMLV AYDNAVNLSC KYSYNLFSRE FRASLHKGLD

        70         80         90        100        110        120
SAVEVCVVYG NYSQQLQVYS KTGFNCDGKL GNESVTFYLQ NLYVNQTDIY FCKIEVMYPP

       130        140        150        160        170        180
PYLDNEKSNG TIIHVKGKHL CPSPLFPGPS KPFWVLVVVG GVLACYSLLV TVAFIIFWVR

       190        200        210        220
SKRSRLLHSD YMNMTPRRPG PTRKHYQPYA PPRDFAAYRS
```

1-18 pepdite segnale

19-152 dominio extracellulare

153-179 dominio transmembrana

180-220 dominio intracellulare

Posizione 186-187 LL→GG

Tabella 6 Uniprot Q07011 4-1BB(SEQ ID NO: 15)

```
    10         20         30         40         50         60
MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR

        70         80         90        100        110        120
TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC

       130        140        150        160        170        180
CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE

       190        200        210        220        230        240
PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG

       250
CSCRFPEEEE GGCEL
```

1-23 peptide segnale

24-186 dominio extracellulare

187-213 dominio transmembrana

214-255   dominio intracellulare

Tabella 7 Uniprot P20963 CD3ζ umano isoforma 3 (SEQ ID NO:16)

```
10         20         30         40         50         60
MKWKALFTAA ILQAQLPITE AQSFGLLDPK LCYLLDGILF IYGVILTALF LRVKFSRSAD

        70         80         90        100        110        120
APAYQQGQNQ LYNELNLGRR EEYDVLDKRR GRDPEMGGKP QRRKNPQEGL YNELQKDKMA

       130        140        150        160
EAYSEIGMKG ERRRGKGHDG LYQGLSTATK DTYDALHMQA LPPR
```

1-21 peptide segnale

22-30 extracellulare

31-51 transmembrana

52-164 dominio intracellulare

61-89 ITAMI

100-128 ITAM2

131-159 ITAM3

Tabella 8 Sequenze di regione cerniera esemplificative

IgG1 umana EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:17)

IgG2 umana ERKCCVECPPCP (SEQ ID NO:18)

IgG3 umana ELKTPLGDTHTCPRCP $(EPKSCDTPPPCPRCP)_3$ (SEQ ID NO:19)

IgG4 umana ESKYGPPCPSCP (SEQ ID NO:20)

IgG4 umana modificata ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO:21)

IgG4 umana modificata YGPPCPPCP (SEQ ID NO:51)

IgG4 umana modificata KYGPPCPPCP (SEQ ID NO:52)

IgG4 umana modificata EVVKYGPPCPPCP (SEQ ID NO:53)

Tabella 9

CAR con Distanziatore lungo R12: PJ_R12-CH2-CH3-41BB-Z-T2A-tEGFR (SEQ ID NO:37)

GTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCT
TAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTG
TGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATC
TCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAG
CTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAGGG
GCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGA
GAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGATGGGA
AAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAAGAAAAAATATAAATTAAAACATATAG
TATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAA
CATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACA
GGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTG
CATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGA
AGAGCAAAACAAAAGTAAGAAAAAAGCACAGCAAGCAGCAGCTGACACAGGA
CACAGCAATCAGGTCAGCCAAAATTACCCTATAGTGCAGAACATCCAGGGGCA
AATGGTACATCAGGCCATATCACCTAGAACTTTAAATGCATGGGTAAAAGTAGT
AGAAGAGAAGGCTTTCAGCCCAGAAGTGATACCCATGTTTTCAGCATTATCAGA
AGGAGCCACCCCACAAGATTTAAACACCATGCTAAACACAGTGGGGGGACATC
AAGCAGCCATGCAAATGTTAAAAGAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGGCAAA
GAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCC
TTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTG
ACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTG
CTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATC
AAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACA
GCTCCTGGGGATTTGGGGTTGCTCTGGAAAACTCATTTGCACCACTGCTGTGCCT
TGGATCTACAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTG
GGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAA
ACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTAC
AGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGGGATCAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGG
GTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGAGGATCTGCGATCGCTCCGGTGCCCGTCA
GTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGGAGGGGTCG
GCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGAT
GTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGT
GCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAG
CTGAAGCTTCGAGGGGCTCGCATCTCTCCTTCACGCGCCCGCCGCCCTACCTGA
GGCCGCCATCCACGCCGGTTGAGTCGCGTTCTGCCGCCTCCCGCCTGTGGTGCC
TCCTGAACTGCGTCCGCCGTCTAGGTAAGTTTAAAGCTCAGGTCGAGACCGGGC
CTTTGTCCGGCGCTCCCTTGGAGCCTACCTAGACTCAGCCGGCTCTCCACGCTTT
GCCTGACCCTGCTTGCTCAACTCTACGTCTTTGTTTCGTTTTCTGTTCTGCGCCGT
TACAGATCCAAGCTGTGACCGGCGCCTACG
GCTAGCGAATTCCTCGAGGCC
ACCATGCTGCTGCTGGTGACAAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCCCACCCCGCC
TTTCTGCTGATCCCCCAGGAACAGCTCGTCGAAAGCGGCGGCAGACTGGTGACA
CCTGGCGGCAGCCTGACCCTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTTCGACTTCAGCGCC

TACTACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGATCGCC
ACCATCTACCCCAGCAGCGGCAAGACCTACTACGCCACCTGGGTGAACGGACG
GTTCACCATCTCCAGCGACAACGCCCAGAACACCGTGGACCTGCAGATGAACA
GCCTGACAGCCGCCGACCGGGCCACCTACTTTTGCGCCAGAGACAGCTACGCCG
ACGACGGCGCCCTGTTCAACATCTGGGGCCCTGGCACCCTGGTGACAATCTCTA
GCGGCGGAGGCGGATCTGGTGGCGGAGGAAGTGGCGGCGGAGGATCTGAGCTG
GTGCTGACCCAGAGCCCCTCTGTGTCTGCTGCCCTGGGAAGCCCTGCCAAGATC
ACCTGTACCCTGAGCAGCGCCCACAAGACCGACACCATCGACTGGTATCAGCA
GCTGCAGGGCGAGGCCCCCAGATACCTGATGCAGGTGCAGAGCGACGGCAGCT
ACACCAAGAGGCCAGGCGTGCCCGACCGGTTCAGCGGATCTAGCTCTGGCGCC
GACCGCTACCTGATCATCCCCAGCGTGCAGGCCGATGACGAGGCCGATTACTAC
TGTGGCGCCGACTACATCGGCGGCTACGTGTTCGGCGGAGGCACCCAGCTGACC
GTGACCGGCGAGTCTAAG

Distanziatore IgG4

TA CGGACCG CCCTGCCCCCCTTGCCCT

CH2

GCCCCCGAGTTCCTGGGCGGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAG
GACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTG
AGCCAGGAAGATCCCGAGGTCCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGT
GCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTCAACAGCACCTACCGGG
TGGTGTCTGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACA
AGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCCAGCAGCATCGAAAAGACCATCAGC
AAGGCCAAG

CH3

GGCCAGCCTCGCGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCTCCCTCCCAGGAAGAGATG
ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGAC
ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCAC
CCCTCCCGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCCGGCTGACCGT
GGACAAGAGCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTCTTTAGCTGCAGCGTGATGCACG
AGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAG

4-1BB

ATGTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTGGGCGGGGTGCTGGCCTGCTACAGCCTGCTG
GTGACAGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTGAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTG
TATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGAT
GGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG

CD3 zeta

CGGGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCGACGCCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAA
TCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGAAGGGAAGAGTACGACGTCCTGG
ATAAGCGGAGAGGCCGGGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCTCGGCGGAAGAAC
CCCCAGGAAGGCCTGTATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTA
CAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGGCGGGGCAAGGGCCACGACGGC
CTGTATCAGGGCCTGTCCACCGCCACCAAGGATACCTACGACGCCCTGCACATG
CAGGCCCTGCCCCCAAGG

T2A

CTCGAG GGCGGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGA
GGAGAATCCCGGCCCTAGG

tEGFR

ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCC
TCCTGATCCCACGCAAAGTGTGTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACT
CACTCTCCATAAATGCTACGAATATTAAACACTTCAAAAACTGCACCTCCATCA
GTGGCGATCTCCACATCCTGCCGGTGGCATTTAGGGGTGACTCCTTCACACATA
CTCCTCCTCTGGATCCACAGGAACTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCA
CAGGGTTTTTGCTGATTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCCT
TTGAGAACCTAGAAATCATACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTC
TTGCAGTCGTCAGCCTGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGA
TAAGTGATGGAGATGTGATAATTTCAGGAAACAAAAATTTGTGCTATGCAAATA
CAATAAACTGGAAAAAACTGTTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACCAAAATTATA
AGCAACAGAGGTGAAAACAGCTGCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTT
GTGCTCCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCGGAGCCCAGGGACTGCGTCTCTTGCCG
GAATGTCAGCCGAGGCAGGGAATGCGTGGACAAGTGCAACCTTCTGGAGGGTG
AGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGTGCATACAGTGCCACCCAGAGTGC
CTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGACGGGGACCAGACAACTGTATC
CAGTGTGCCCACTACATTGACGGCCCCCACTGCGTCAAGACCTGCCCGGCAGGA
GTCATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTACGCAGACGCCGGCCATGT
GTGCCACCTGTGCCATCCAAACTGCACCTACGGATGCACTGGGCCAGGTCTTGA
AGGCTGTCCAACGAATGGGCCTAAGATCCCGTCCATCGCCACTGGGATGGTGGG
GGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTGGTGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCATGTGA
GCGGCCGCTCTAGACCCGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATAATC
AACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGC
TCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTT
CCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTAT
GAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCT
GACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGG
ACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTG
CCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTGT
CGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCT
GCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCT
TCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTC
AGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCATCGATACCGTCGACTAG
CCGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTT
AAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACTCCCAAAGAAGACAAGATC
TGCTTTTTGCCTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCT
CTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGT
GCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTC
AGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGAATTCGATATCAAGCTTAT
CGATACCGTCGACCTCGAGGGGGGGCCCGGTACCCAATTCGCCCTATAGTGAGT
CGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTG
GCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAA
TAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGG
CGAATGGAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTT
AAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAAT
CAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGGAACAAGAGT
CCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCA

GGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAG
GTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCCGATTTAGAGCTTG
ACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGA
GCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTAACCACCAC
ACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCAGGTGGCACTTTTCGGGG
AAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTAT
CCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAG
AGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTG
CCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGA
TCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGAT
CCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTT
CTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGT
CGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAA
AAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACC
ATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAA
GGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCG
TTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGA
TGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTA
CTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAG
GACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGG
AGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAA
GCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGA
ACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACT
GTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAA
TTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTT
AACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGAT
CTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACC
ACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCG
AAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAG
CCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCT
CTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCG
GGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACG
GGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAG
ATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGG
CGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGA
GCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTC
TGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAA
AACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTC
ACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTT
GAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGT
GAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTT
GGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCA
GTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTT
TACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATT
TCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCGAAATTAACCCTCA
CTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCTCGAGGTCGAGA
TCCGGTCGACCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTA

ACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTA
TGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAG
GCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTCGACGGTATCGATTGGCTCA
TGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAAT
CAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAAC
TTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGT
CAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTC
AATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATC
ATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGC
ATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGT
ATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCG
TGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAA
TGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAA
CTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGAATTCGGAGTGGCG
AGCCCTCAGATCCTGCATATAAGCAGCTGCTTTTTGCCTGTACTGGGTCTCTCTG

Tabella 10

Leader RI 2- Cerniera-CH2-CH3- CD28tm/41BB-Z-T2A-tEGFR (SEQ ID NO:38)

Leader

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP

R12 scFv

QEQLVESGGRLVTPGGSLTLSCKASGFDFSAYYMSWVRQAPGKGLEWIATIYPSSG
KTYYATWVNGRFTISSDNAQNTVDLQMNSLTAADRATYFCARDSYADDGALFNI
WGPGTLVTISSGGGGSGGGGSGGGGSELVLTQSPSVSAALGSPAKITCTLSSAHKTD
TIDWYQQLQGEAPRYLMQVQSDGSYTKRPGVPDRFSGSSSGADRYLIIPSVQADDE
ADYYCGADYIGGYVFGGGTQLTVTG

Cerniera distanziatore

ESKYGPPCPPCP

CH2

APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK

CH3

GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

CD28

MFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV

4-1BB

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

CD3 zeta

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP
QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ
ALPPR

T2A

LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR

tEGFR

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHI
LPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRT
KQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQK
TKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLE
GEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVM
GENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPKIPSIATGMVGALL
LLLVVALGIGLFM

Tabella 11

CAR con distanziatore intermedio R12: PJ_R12-CH3-41BB-Z-T2A-tEGFR (SEQ ID NO:39)

GTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCT
TAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTG
TGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATC
TCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAG
CTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAGGG
GCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGA
GAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGATGGGA
AAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAAGAAAAAATATAAATTAAAACATATAG
TATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAA
CATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACA
GGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTG
CATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGA
AGAGCAAAACAAAAGTAAGAAAAAAGCACAGCAAGCAGCAGCTGACACAGGA
CACAGCAATCAGGTCAGCCAAAATTACCCTATAGTGCAGAACATCCAGGGGCA
AATGGTACATCAGGCCATATCACCTAGAACTTTAAATGCATGGGTAAAAGTAGT
AGAAGAGAAGGCTTTCAGCCCAGAAGTGATACCCATGTTTTCAGCATTATCAGA
AGGAGCCACCCCACAAGATTTAAACACCATGCTAAACACAGTGGGGGGACATC
AAGCAGCCATGCAAATGTTAAAAGAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGGCAAA
GAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCC
TTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTG
ACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTG
CTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATC
AAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACA
GCTCCTGGGGATTTGGGGTTGCTCTGGAAAACTCATTTGCACCACTGCTGTGCCT
TGGATCTACAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTG
GGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAA
ACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTAC
AGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGGGATCAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGG
GTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGAGGATCTGCGATCGCTCCGGTGCCCGTCA
GTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGGAGGGGTCG
GCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGAT
GTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGT
GCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAG
CTGAAGCTTCGAGGGGCTCGCATCTCTCCTTCACGCGCCCGCCGCCCTACCTGA
GGCCGCCATCCACGCCGGTTGAGTCGCGTTCTGCCGCCTCCCGCCTGTGGTGCC
TCCTGAACTGCGTCCGCCGTCTAGGTAAGTTTAAAGCTCAGGTCGAGACCGGGC
CTTTGTCCGGCGCTCCCTTGGAGCCTACCTAGACTCAGCCGGCTCTCCACGCTTT
GCCTGACCCTGCTTGCTCAACTCTACGTCTTTGTTTCGTTTTCTGTTCTGCGCCGT
TACAGATCCAAGCTGTGACCGGCGCCTACG
GCTAGCGAATTCCTCGAGGCC

R12 ScFv

ACCATGCTGCTGCTGGTGACAAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCCCACCCCGCC
TTTCTGCTGATCCCCCAGGAACAGCTCGTCGAAAGCGGCGGCAGACTGGTGACA

CCTGGCGGCAGCCTGACCCTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTTCGACTTCAGCGCC
TACTACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGATCGCC
ACCATCTACCCCAGCAGCGGCAAGACCTACTACGCCACCTGGGTGAACGGACG
GTTCACCATCTCCAGCGACAACGCCCAGAACACCGTGGACCTGCAGATGAACA
GCCTGACAGCCGCCGACCGGGCCACCTACTTTTGCGCCAGAGACAGCTACGCCG
ACGACGGCGCCCTGTTCAACATCTGGGGCCCTGGCACCCTGGTGACAATCTCTA
GCGGCGGAGGCGGATCTGGTGGCGGAGGAAGTGGCGGCGGAGGATCTGAGCTG
GTGCTGACCCAGAGCCCCTCTGTGTCTGCTGCCCTGGGAAGCCCTGCCAAGATC
ACCTGTACCCTGAGCAGCGCCCACAAGACCGACACCATCGACTGGTATCAGCA
GCTGCAGGGCGAGGCCCCCAGATACCTGATGCAGGTGCAGAGCGACGGCAGCT
ACACCAAGAGGCCAGGCGTGCCCGACCGGTTCAGCGGATCTAGCTCTGGCGCC
GACCGCTACCTGATCATCCCCAGCGTGCAGGCCGATGACGAGGCCGATTACTAC
TGTGGCGCCGACTACATCGGCGGCTACGTGTTCGGCGGAGGCACCCAGCTGACC
GTGACCGGCGAGTCTAAG

Cerniera distanziatore

TA CGGACCG CCCTGCCCCCCTTGCCCT

CH3

GGCCAGCCTCGCGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCTCCCTCCCAGGAAGAGATG
ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGAC
ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCAC
CCCTCCCGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCCGGCTGACCGT
GGACAAGAGCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTCTTTAGCTGCAGCGTGATGCACG
AGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAG

4-1BB

ATGTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTGGGCGGGGTGCTGGCCTGCTACAGCCTGCTG
GTGACAGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTGAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTG
TATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGAT
GGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG

CD3zeta

CGGGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCGACGCCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAA
TCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGAAGGGAAGAGTACGACGTCCTGG
ATAAGCGGAGAGGCCGGGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCTCGGCGGAAGAAC
CCCCAGGAAGGCCTGTATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTA
CAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGGCGGGGCAAGGGCCACGACGGC
CTGTATCAGGGCCTGTCCACCGCCACCAAGGATACCTACGACGCCCTGCACATG
CAGGCCCTGCCCCCAAGG

T2A

CTCGAG GGCGGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGA
GGAGAATCCCGGCCCTAGG

tEGFR

ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCC
TCCTGATCCCACGCAAAGTGTGTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACT
CACTCTCCATAAATGCTACGAATATTAAACACTTCAAAAACTGCACCTCCATCA
GTGGCGATCTCCACATCCTGCCGGTGGCATTTAGGGGTGACTCCTTCACACATA
CTCCTCCTCTGGATCCACAGGAACTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCA
CAGGGTTTTTGCTGATTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCCT
TTGAGAACCTAGAAATCATACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTC

TTGCAGTCGTCAGCCTGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGA
TAAGTGATGGAGATGTGATAATTTCAGGAAACAAAAATTTGTGCTATGCAAATA
CAATAAACTGGAAAAAACTGTTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACCAAAATTATA
AGCAACAGAGGTGAAAACAGCTGCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTT
GTGCTCCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCGGAGCCCAGGGACTGCGTCTCTTGCCG
GAATGTCAGCCGAGGCAGGGAATGCGTGGACAAGTGCAACCTTCTGGAGGGTG
AGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGTGCATACAGTGCCACCCAGAGTGC
CTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGACGGGGACCAGACAACTGTATC
CAGTGTGCCCACTACATTGACGGCCCCCACTGCGTCAAGACCTGCCCGGCAGGA
GTCATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTACGCAGACGCCGGCCATGT
GTGCCACCTGTGCCATCCAAACTGCACCTACGGATGCACTGGGCCAGGTCTTGA
AGGCTGTCCAACGAATGGGCCTAAGATCCCGTCCATCGCCACTGGGATGGTGGG
GGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTGGTGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCATGTGA
GCGGCCGCTCTAGACCCGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATAATC
AACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGC
TCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTT
CCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTAT
GAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCT
GACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGG
ACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTG
CCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTGT
CGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCT
GCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCT
TCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTC
AGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCATCGATACCGTCGACTAG
CCGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTT
AAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACTCCCAAAGAAGACAAGATC
TGCTTTTTGCCTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCT
CTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGT
GCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTC
AGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGAATTCGATATCAAGCTTAT
CGATACCGTCGACCTCGAGGGGGGGCCCGGTACCCAATTCGCCCTATAGTGAGT
CGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTG
GCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAA
TAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGG
CGAATGGAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTT
AAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAAT
CAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGGAACAAGAGT
CCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCA
GGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAG
GTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCCGATTTAGAGCTTG
ACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGA
GCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTAACCACCAC
ACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCAGGTGGCACTTTTCGGGG
AAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTAT
CCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAG
AGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTG

CCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGA
TCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGAT
CCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTT
CTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGT
CGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAA
AAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACC
ATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAA
GGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCG
TTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGA
TGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTA
CTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAG
GACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGG
AGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAA
GCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGA
ACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACT
GTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAA
TTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTT
AACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGAT
CTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACC
ACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCG
AAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAG
CCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCT
CTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCG
GGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACG
GGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAG
ATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGG
CGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGA
GCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTC
TGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAA
AACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTC
ACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTT
GAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGT
GAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTT
GGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCA
GTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTT
TACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATT
TCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCGAAATTAACCCTCA
CTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCTCGAGGTCGAGA
TCCGGTCGACCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTA
ACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTA
TGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAG
GCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTCGACGGTATCGATTGGCTCA
TGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAAT
CAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAAC
TTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGT
CAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTC
AATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATC

ATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGC
ATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGT
ATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCG
TGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAA
TGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAA
CTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGAATTCGGAGTGGCG
AGCCCTCAGATCCTGCATATAAGCAGCTGCTTTTTGCCTGTACTGGGTCTCTCTG

Tabella 12

Leader R12- Cerniera- CH3- CD28tm/41BB-Z-T2A-tEGFR (SEQ ID NO:40)

Leader

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP

R12 scFV

QEQLVESGGRLVTPGGSLTLSCKASGFDFSAYYMSWVRQAPGKGLEWIATIYPSSG
KTYYATWVNGRFTISSDNAQNTVDLQMNSLTAADRATYFCARDSYADDGALFNI
WGPGTLVTISSGGGGSGGGGSGGGGSELVLTQSPSVSAALGSPAKITCTLSSAHKTD
TIDWYQQLQGEAPRYLMQVQSDGSYTKRPGVPDRFSGSSSGADRYLIIPSVQADDE
ADYYCGADYIGGYVFGGGTQLTVTG

Cerniera distanziatore

ESKYGPPCPPCP

CH3

GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

CD28tm

MFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV

4-1BB

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

CD3 zeta

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP
QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ
ALPPR

T2A

LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR

tEGFR

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHI
LPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRT
KQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQK
TKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLE
GEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVM
GENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPKIPSIATGMVGALL
LLLVVALGIGLFM

Tabella 13

CAR con distanziatore corto R12: PJ_R12-Cerniera-41BB-Z-T2A-tEGFR (SEQ ID NO:41)

GTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCT
TAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTG
TGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATC
TCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAG
CTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAGGG
GCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGA
GAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGATGGGA
AAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAAGAAAAAATATAAATTAAAACATATAG
TATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAA
CATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACA
GGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTG
CATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGA
AGAGCAAAACAAAAGTAAGAAAAAAGCACAGCAAGCAGCAGCTGACACAGGA
CACAGCAATCAGGTCAGCCAAAATTACCCTATAGTGCAGAACATCCAGGGGCA
AATGGTACATCAGGCCATATCACCTAGAACTTTAAATGCATGGGTAAAAGTAGT
AGAAGAGAAGGCTTTCAGCCCAGAAGTGATACCCATGTTTTCAGCATTATCAGA
AGGAGCCACCCCACAAGATTTAAACACCATGCTAAACACAGTGGGGGGACATC
AAGCAGCCATGCAAATGTTAAAAGAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGGCAAA
GAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCC
TTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTG
ACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTG
CTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATC
AAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACA
GCTCCTGGGGATTTGGGGTTGCTCTGGAAAACTCATTTGCACCACTGCTGTGCCT
TGGATCTACAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTG
GGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAA
ACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTAC
AGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGGGATCAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGG
GTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGAGGATCTGCGATCGCTCCGGTGCCCGTCA
GTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCG
GCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGAT
GTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGT
GCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAG
CTGAAGCTTCGAGGGGCTCGCATCTCTCCTTCACGCGCCCGCCGCCCTACCTGA
GGCCGCCATCCACGCCGGTTGAGTCGCGTTCTGCCGCCTCCCGCCTGTGGTGCC
TCCTGAACTGCGTCCGCCGTCTAGGTAAGTTTAAAGCTCAGGTCGAGACCGGGC
CTTTGTCCGGCGCTCCCTTGGAGCCTACCTAGACTCAGCCGGCTCTCCACGCTTT
GCCTGACCCTGCTTGCTCAACTCTACGTCTTTGTTTCGTTTTCTGTTCTGCGCCGT
TACAGATCCAAGCTGTGACCGGCGCCTACG

GCTAGF

R12 scFV

ACCATGCTGCTGCTGGTGACAAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCCCACCCCGCC
TTTCTGCTGATCCCCCAGGAACAGCTCGTCGAAAGCGGCGGCAGACTGGTGACA
CCTGGCGGCAGCCTGACCCTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTTCGACTTCAGCGCC

TACTACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGATCGCC
ACCATCTACCCCAGCAGCGGCAAGACCTACTACGCCACCTGGGTGAACGGACG
GTTCACCATCTCCAGCGACAACGCCCAGAACACCGTGGACCTGCAGATGAACA
GCCTGACAGCCGCCGACCGGGCCACCTACTTTTGCGCCAGAGACAGCTACGCCG
ACGACGGCGCCCTGTTCAACATCTGGGGCCCTGGCACCCTGGTGACAATCTCTA
GCGGCGGAGGCGGATCTGGTGGCGGAGGAAGTGGCGGCGGAGGATCTGAGCTG
GTGCTGACCCAGAGCCCCTCTGTGTCTGCTGCCCTGGGAAGCCCTGCCAAGATC
ACCTGTACCCTGAGCAGCGCCCACAAGACCGACACCATCGACTGGTATCAGCA
GCTGCAGGGCGAGGCCCCCAGATACCTGATGCAGGTGCAGAGCGACGGCAGCT
ACACCAAGAGGCCAGGCGTGCCCGACCGGTTCAGCGGATCTAGCTCTGGCGCC
GACCGCTACCTGATCATCCCCAGCGTGCAGGCCGATGACGAGGCCGATTACTAC
TGTGGCGCCGACTACATCGGCGGCTACGTGTTCGGCGGAGGCACCCAGCTGACC
GTGACCGGCGAGTCTAAG

Cerniera/ distanziatore

TA CGGACCG CCCTGCCCCCCTTGCCCT

4-1BB

ATGTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTGGGCGGGGTGCTGGCCTGCTACAGCCTGCTG
GTGACAGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTGAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTG
TATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGAT
GGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG

CD3 zeta

CGGGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCGACGCCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAA
TCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGAAGGGAAGAGTACGACGTCCTGG
ATAAGCGGAGAGGCCGGGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCTCGGCGGAAGAAC
CCCCAGGAAGGCCTGTATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTA
CAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGGCGGGGCAAGGGCCACGACGGC
CTGTATCAGGGCCTGTCCACCGCCACCAAGGATACCTACGACGCCCTGCACATG
CAGGCCCTGCCCCCAAGG

T2A

CTCGAGGGCGGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGA
GGAGAATCCCGGCCCTAGG

tEGFR

ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCC
TCCTGATCCCACGCAAAGTGTGTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACT
CACTCTCCATAAATGCTACGAATATTAAACACTTCAAAAACTGCACCTCCATCA
GTGGCGATCTCCACATCCTGCCGGTGGCATTTAGGGGTGACTCCTTCACACATA
CTCCTCCTCTGGATCCACAGGAACTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCA
CAGGGTTTTTGCTGATTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCCT
TTGAGAACCTAGAAATCATACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTC
TTGCAGTCGTCAGCCTGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGA
TAAGTGATGGAGATGTGATAATTTCAGGAAACAAAAATTTGTGCTATGCAAATA
CAATAAACTGGAAAAAACTGTTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACCAAAATTATA
AGCAACAGAGGTGAAAACAGCTGCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTT
GTGCTCCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCGGAGCCCAGGGACTGCGTCTCTTGCCG
GAATGTCAGCCGAGGCAGGGAATGCGTGGACAAGTGCAACCTTCTGGAGGGTG
AGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGTGCATACAGTGCCACCCAGAGTGC
CTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGACGGGGACCAGACAACTGTATC

CAGTGTGCCCACTACATTGACGGCCCCCACTGCGTCAAGACCTGCCCGGCAGGA
GTCATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTACGCAGACGCCGGCCATGT
GTGCCACCTGTGCCATCCAAACTGCACCTACGGATGCACTGGGCCAGGTCTTGA
AGGCTGTCCAACGAATGGGCCTAAGATCCCGTCCATCGCCACTGGGATGGTGGG
GGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTGGTGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCATGTGA
GCGGCCGCTCTAGACCCGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATAATC
AACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGC
TCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTT
CCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTAT
GAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCT
GACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGG
ACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTG
CCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTGT
CGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCT
GCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCT
TCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTC
AGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCATCGATACCGTCGACTAG
CCGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTT
AAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACTCCCAAAGAAGACAAGATC
TGCTTTTTGCCTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCT
CTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGT
GCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTC
AGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGAATTCGATATCAAGCTTAT
CGATACCGTCGACCTCGAGGGGGGGCCCGGTACCCAATTCGCCCTATAGTGAGT
CGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTG
GCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAA
TAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGG
CGAATGGAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTT
AAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAAT
CAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGGAACAAGAGT
CCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCA
GGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAG
GTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCCGATTTAGAGCTTG
ACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGA
GCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTAACCACCAC
ACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCAGGTGGCACTTTTCGGGG
AAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTAT
CCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAG
AGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTG
CCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGA
TCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGAT
CCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTT
CTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGT
CGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAA
AAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACC
ATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAA
GGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCG

TTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGA
TGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTA
CTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAG
GACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGG
AGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAA
GCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGA
ACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACT
GTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAA
TTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTT
AACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGAT
CTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACC
ACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCG
AAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAG
CCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCT
CTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCG
GGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACG
GGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAG
ATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGG
CGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGA
GCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTC
TGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAA
AACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTC
ACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTT
GAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGT
GAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTT
GGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCA
GTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTT
TACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATT
TCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCGAAATTAACCCTCA
CTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCTCGAGGTCGAGA
TCCGGTCGACCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTA
ACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTA
TGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAG
GCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTCGACGGTATCGATTGGCTCA
TGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAAT
CAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAAC
TTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGT
CAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTC
AATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATC
ATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGC
ATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGT
ATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCG
TGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAA
TGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAA
CTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGAATTCGGAGTGGCG
AGCCCTCAGATCCTGCATATAAGCAGCTGCTTTTTGCCTGTACTGGGTCTCTCTG

Tabella 14

Leader _R12 - CD28tm/41BB-Z-T2A-tEGFR(SEQ ID NO:42)

Leader

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP

scFv R12

QEQLVESGGRLVTPGGSLTLSCKASGFDFSAYYMSWVRQAPGKGLEWIATIYPSSG
KTYYATWVNGRFTISSDNAQNTVDLQMNSLTAADRATYFCARDSYADDGALFNI
WGPGTLVTISSGGGGSGGGGSGGGGSELVLTQSPSVSAALGSPAKITCTLSSAHKTD
TIDWYQQLQGEAPRYLMQVQSDGSYTKRPGVPDRFSGSSSGADRYLIIPSVQADDE
ADYYCGADYIGGYVFGGGTQLTVTG

Cerniera/distanziatore

ESKYGPPCPPCP

CD28tm

MFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV

4-1BB

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

CD3zeta

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP
QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ
ALPPR

T2A

LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR

tEGFR

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHI
LPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRT
KQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQK
TKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLE
GEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVM
GENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPKIPSIATGMVGALL
LLLVVALGIGLFM

Tabella 15

CAR con distanziatore lungo: PJ_R1l-CH2-CH3-41BB-Z-T2A-tEGFR (SEQ ID NO:43)

GTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCT
TAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTG
TGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATC
TCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAG
CTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAGGG
GCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGA
GAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGATGGGA
AAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAAGAAAAAATATAAATTAAAACATATAG
TATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAA
CATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACA
GGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTG
CATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGA
AGAGCAAAACAAAAGTAAGAAAAAAGCACAGCAAGCAGCAGCTGACACAGGA
CACAGCAATCAGGTCAGCCAAAATTACCCTATAGTGCAGAACATCCAGGGGCA
AATGGTACATCAGGCCATATCACCTAGAACTTTAAATGCATGGGTAAAAGTAGT
AGAAGAGAAGGCTTTCAGCCCAGAAGTGATACCCATGTTTTCAGCATTATCAGA
AGGAGCCACCCCACAAGATTTAAACACCATGCTAAACACAGTGGGGGGACATC
AAGCAGCCATGCAAATGTTAAAAGAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGGCAAA
GAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCC
TTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTG
ACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTG
CTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATC
AAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACA
GCTCCTGGGGATTTGGGGTTGCTCTGGAAAACTCATTTGCACCACTGCTGTGCCT
TGGATCTACAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTG
GGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAA
ACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTAC
AGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGGGATCAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGG
GTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGAGGATCTGCGATCGCTCCGGTGCCCGTCA
GTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGGAGGGGTCG
GCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGAT
GTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGT
GCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAG
CTGAAGCTTCGAGGGGCTCGCATCTCTCCTTCACGCGCCCGCCGCCCTACCTGA
GGCCGCCATCCACGCCGGTTGAGTCGCGTTCTGCCGCCTCCCGCCTGTGGTGCC
TCCTGAACTGCGTCCGCCGTCTAGGTAAGTTTAAAGCTCAGGTCGAGACCGGGC
CTTTGTCCGGCGCTCCCTTGGAGCCTACCTAGACTCAGCCGGCTCTCCACGCTTT
GCCTGACCCTGCTTGCTCAACTCTACGTCTTTGTTTCGTTTTCTGTTCTGCGCCGT
TACAGATCCAAGCTGTGACCGGCGCCTACG
GCTAGC

scFv R12

GAATTCGCCACCATGCTGCTGCTGGTGACAAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCC
CACCCCGCCTTTCTGCTGATCCCCCAGAGCGTGAAAGAGTCCGAGGGCGACCTG

GTCACACCAGCCGGCAACCTGACCCTGACCTGTACCGCCAGCGGCAGCGACATC
AACGACTACCCCATCTCTTGGGTCCGCCAGGCTCCTGGCAAGGGACTGGAATGG
ATCGGCTTCATCAACAGCGGCGGCAGCACTTGGTACGCCAGCTGGGTCAAAGGC
CGGTTCACCATCAGCCGGACCAGCACCACCGTGGACCTGAAGATGACAAGCCT
GACCACCGACGACACCGCCACCTACTTTTGCGCCAGAGGCTACAGCACCTACTA
CGGCGACTTCAACATCTGGGGCCCTGGCACCCTGGTCACAATCTCTAGCGGCGG
AGGCGGCAGCGGAGGTGGAGGAAGTGGCGGCGGAGGATCCGAGCTGGTCATGA
CCCAGACCCCCAGCAGCACATCTGGCGCCGTGGGCGGCACCGTGACCATCAATT
GCCAGGCCAGCCAGAGCATCGACAGCAACCTGGCCTGGTTCCAGCAGAAGCCC
GGCCAGCCCCCCACCCTGCTGATCTACAGAGCCTCCAACCTGGCCAGCGGCGTG
CCAAGCAGATTCAGCGGCAGCAGATCTGGCACCGAGTACACCCTGACCATCTCC
GGCGTGCAGAGAGAGGACGCCGCTACCTATTACTGCCTGGGCGGCGTGGGCAA
CGTGTCCTACAGAACCAGCTTCGGCGGAGGTACTGAGGTGGTCGTCAAA

Cerniera/distanziatore corto

TA CGGACCG CCCTGCCCCCCTTGCCCT

CH2

GCCCCCGAGTTCCTGGGCGGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAG
GACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTG
AGCCAGGAAGATCCCGAGGTCCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGT
GCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTCAACAGCACCTACCGGG
TGGTGTCTGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACA
AGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCCAGCAGCATCGAAAAGACCATCAGC
AAGGCCAAG

CH3

GGCCAGCCTCGCGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCTCCCTCCCAGGAAGAGATG
ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGAC
ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCAC
CCCTCCCGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCCGGCTGACCGT
GGACAAGAGCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTCTTTAGCTGCAGCGTGATGCACG
AGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAG

4-1BB

ATGTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTGGGCGGGGTGCTGGCCTGCTACAGCCTGCTG
GTGACAGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTGAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTG
TATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGAT
GGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG

CD3zeta

CGGGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCGACGCCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAA
TCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGAAGGGAAGAGTACGACGTCCTGG
ATAAGCGGAGAGGCCGGGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCTCGGCGGAAGAAC
CCCCAGGAAGGCCTGTATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTA
CAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGGCGGGGCAAGGGCCACGACGGC
CTGTATCAGGGCCTGTCCACCGCCACCAAGGATACCTACGACGCCCTGCACATG
CAGGCCCTGCCCCCAAGG

T2A

CTCGAG GGCGGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGA
GGAGAATCCCGGCCCTAGG

tEGFR

ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCC
TCCTGATCCCACGCAAAGTGTGTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACT
CACTCTCCATAAATGCTACGAATATTAAACACTTCAAAAACTGCACCTCCATCA
GTGGCGATCTCCACATCCTGCCGGTGGCATTTAGGGGTGACTCCTTCACACATA
CTCCTCCTCTGGATCCACAGGAACTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCA
CAGGGTTTTTGCTGATTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCCT
TTGAGAACCTAGAAATCATACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTC
TTGCAGTCGTCAGCCTGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGA
TAAGTGATGGAGATGTGATAATTTCAGGAAACAAAAATTTGTGCTATGCAAATA
CAATAAACTGGAAAAAACTGTTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACCAAAATTATA
AGCAACAGAGGTGAAAACAGCTGCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTT
GTGCTCCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCGGAGCCCAGGGACTGCGTCTCTTGCCG
GAATGTCAGCCGAGGCAGGGAATGCGTGGACAAGTGCAACCTTCTGGAGGGTG
AGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGTGCATACAGTGCCACCCAGAGTGC
CTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGACGGGGACCAGACAACTGTATC
CAGTGTGCCCACTACATTGACGGCCCCCACTGCGTCAAGACCTGCCCGGCAGGA
GTCATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTACGCAGACGCCGGCCATGT
GTGCCACCTGTGCCATCCAAACTGCACCTACGGATGCACTGGGCCAGGTCTTGA
AGGCTGTCCAACGAATGGGCCTAAGATCCCGTCCATCGCCACTGGGATGGTGGG
GGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTGGTGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCATGTGA

GCGGCCGCTCTAGACCCGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATAATC
AACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGC
TCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTT
CCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTAT
GAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCT
GACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGG
ACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTG
CCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTGT
CGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCT
GCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCT
TCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTC
AGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCATCGATACCGTCGACTAG
CCGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTT
AAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACTCCCAAAGAAGACAAGATC
TGCTTTTTGCCTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCT
CTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGT
GCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTC
AGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGAATTCGATATCAAGCTTAT
CGATACCGTCGACCTCGAGGGGGGGCCCGGTACCCAATTCGCCCTATAGTGAGT
CGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTG
GCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAA
TAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGG
CGAATGGAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTT
AAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAAT
CAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGGAACAAGAGT

CCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCA
GGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAG
GTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCCGATTTAGAGCTTG
ACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGA
GCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTAACCACCAC
ACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCAGGTGGCACTTTTCGGGG
AAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTAT
CCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAG
AGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTG
CCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGA
TCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGAT
CCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTT
CTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGT
CGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAA
AAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACC
ATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAA
GGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCG
TTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGA
TGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTA
CTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAG
GACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGG
AGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAA
GCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGA
ACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACT
GTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAA
TTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTT
AACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGAT
CTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACC
ACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCG
AAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAG
CCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCT
CTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCG
GGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACG
GGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAG
ATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGG
CGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGA
GCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTC
TGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAA
AACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTC
ACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTT
GAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGT
GAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTT
GGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCA
GTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTT
TACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATT
TCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCGAAATTAACCCTCA
CTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCTCGAGGTCGAGA

TCCGGTCGACCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTA
ACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTA
TGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAG
GCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTCGACGGTATCGATTGGCTCA
TGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAAT
CAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAAC
TTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGT
CAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTC
AATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATC
ATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGC
ATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGT
ATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCG
TGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAA
TGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAA
CTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGAATTCGGAGTGGCG
AGCCCTCAGATCCTGCATATAAGCAGCTGCTTTTTGCCTGTACTGGGTCTCTCTG

Tabella 16

Leader RII - Cerniera-CH2-CH3- CD28tm/41BB-Z-T2A-tEGFR (SEQ TD NO:44)

Leader

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP

R11 scFv

QSVKESEGDLVTPAGNLTLTCTASGSDINDYPISWVRQAPGKGLEWIGFINSGGSTW
YASWVKGRFTISRTSTTVDLKMTSLTTDDTATYFCARGYSTYYGDFNIWGPGTLVT
ISSGGGGSGGGGSGGGGSELVMTQTPSSTSGAVGGTVTINCQASQSIDSNLAWFQQ
KPGQPPTLLIYRASNLASGVPSRFSGSRSGTEYTLTISGVQREDAATYYCLGGVGNV
SYRTSFGGGTEVVVK

Cerniera/distanziatore

ESKYGPPCPPCP

CH2

APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK

CH3

GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

CD28tm

MFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV

4-1BB

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

CD3zeta

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP
QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ
ALPPR

T2A

LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR

tEGFR

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHI
LPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRT
KQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQK
TKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLE
GEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVM
GENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPKIPSIATGMVGALL
LLLVVALGIGLFM

Tabella 17

CAR con distanziatore intermedio R11: PJ_Rl l-CH3-41BB-Z-T2A-tEGFR (SEQ ID NO:45)

GTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCT
TAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTG
TGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATC
TCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAG
CTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAGGG
GCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGA
GAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGATGGGA
AAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAAGAAAAAATATAAATTAAAACATATAG
TATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAA
CATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACA
GGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTG
CATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGA
AGAGCAAAACAAAAGTAAGAAAAAAGCACAGCAAGCAGCAGCTGACACAGGA
CACAGCAATCAGGTCAGCCAAAATTACCCTATAGTGCAGAACATCCAGGGGCA
AATGGTACATCAGGCCATATCACCTAGAACTTTAAATGCATGGGTAAAAGTAGT
AGAAGAGAAGGCTTTCAGCCCAGAAGTGATACCCATGTTTTCAGCATTATCAGA
AGGAGCCACCCCACAAGATTTAAACACCATGCTAAACACAGTGGGGGGACATC
AAGCAGCCATGCAAATGTTAAAAGAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGGCAAA
GAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCC
TTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTG
ACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTG
CTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATC
AAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACA
GCTCCTGGGGATTTGGGGTTGCTCTGGAAAACTCATTTGCACCACTGCTGTGCCT
TGGATCTACAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTG
GGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAA
ACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTAC
AGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGGGATCAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGG
GTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGAGGATCTGCGATCGCTCCGGTGCCCGTCA
GTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGGAGGGGTCG
GCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGAT
GTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGT
GCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAG
CTGAAGCTTCGAGGGGCTCGCATCTCTCCTTCACGCGCCCGCCGCCCTACCTGA
GGCCGCCATCCACGCCGGTTGAGTCGCGTTCTGCCGCCTCCCGCCTGTGGTGCC
TCCTGAACTGCGTCCGCCGTCTAGGTAAGTTTAAAGCTCAGGTCGAGACCGGGC
CTTTGTCCGGCGCTCCCTTGGAGCCTACCTAGACTCAGCCGGCTCTCCACGCTTT
GCCTGACCCTGCTTGCTCAACTCTACGTCTTTGTTTCGTTTTCTGTTCTGCGCCGT
TACAGATCCAAGCTGTGACCGGCGCCTACG
GCTAGC

R11 scFV

GAATTCGCCACCATGCTGCTGCTGGTGACAAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCC
CACCCCGCCTTTCTGCTGATCCCCCAGAGCGTGAAAGAGTCCGAGGGCGACCTG

GTCACACCAGCCGGCAACCTGACCCTGACCTGTACCGCCAGCGGCAGCGACATC
AACGACTACCCCATCTCTTGGGTCCGCCAGGCTCCTGGCAAGGGACTGGAATGG
ATCGGCTTCATCAACAGCGGCGGCAGCACTTGGTACGCCAGCTGGGTCAAAGGC
CGGTTCACCATCAGCCGGACCAGCACCACCGTGGACCTGAAGATGACAAGCCT
GACCACCGACGACACCGCCACCTACTTTTGCGCCAGAGGCTACAGCACCTACTA
CGGCGACTTCAACATCTGGGGCCCTGGCACCCTGGTCACAATCTCTAGCGGCGG
AGGCGGCAGCGGAGGTGGAGGAAGTGGCGGCGGAGGATCCGAGCTGGTCATGA
CCCAGACCCCCAGCAGCACATCTGGCGCCGTGGGCGGCACCGTGACCATCAATT
GCCAGGCCAGCCAGAGCATCGACAGCAACCTGGCCTGGTTCCAGCAGAAGCCC
GGCCAGCCCCCCACCCTGCTGATCTACAGAGCCTCCAACCTGGCCAGCGGCGTG
CCAAGCAGATTCAGCGGCAGCAGATCTGGCACCGAGTACACCCTGACCATCTCC
GGCGTGCAGAGAGAGGACGCCGCTACCTATTACTGCCTGGGCGGCGTGGGCAA
CGTGTCCTACAGAACCAGCTTCGGCGGAGGTACTGAGGTGGTCGTCAAA

Cerniera/distanziatore

TAGGACCGCCCTGCCCCCCTTGCCCT

GCCCCCGAGTTCCTGGGCGGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAG
GACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTG
AGCCAGGAAGATCCCGAGGTCCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGT
GCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTCAACAGCACCTACCGGG
TGGTGTCTGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACA
AGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCCAGCAGCATCGAAAAGACCATCAGC
AAGGCCAAG

CH3

GGCCAGCCTCGCGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCTCCCTCCCAGGAAGAGATG
ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGAC
ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCAC
CCCTCCCGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCCGGCTGACCGT
GGACAAGAGCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTCTTTAGCTGCAGCGTGATGCACG
AGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAG

4-1BB

ATGTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTGGGCGGGGTGCTGGCCTGCTACAGCCTGCTG
GTGACAGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTGAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTG
TATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGAT
GGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG

CD3zeta

CGGGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCGACGCCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAA
TCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGAAGGGAAGAGTACGACGTCCTGG
ATAAGCGGAGAGGCCGGGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCTCGGCGGAAGAAC
CCCCAGGAAGGCCTGTATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTA
CAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGGCGGGGCAAGGGCCACGACGGC
CTGTATCAGGGCCTGTCCACCGCCACCAAGGATACCTACGACGCCCTGCACATG
CAGGCCCTGCCCCCAAGG

T2A

CTCGAGGGCGGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGA
GGAGAATCCCGGCCCTAGG

tEGFR

ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCC
TCCTGATCCCACGCAAAGTGTGTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACT
CACTCTCCATAAATGCTACGAATATTAAACACTTCAAAAACTGCACCTCCATCA
GTGGCGATCTCCACATCCTGCCGGTGGCATTTAGGGGTGACTCCTTCACACATA
CTCCTCCTCTGGATCCACAGGAACTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCA
CAGGGTTTTTGCTGATTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCCT
TTGAGAACCTAGAAATCATACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTC
TTGCAGTCGTCAGCCTGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGA
TAAGTGATGGAGATGTGATAATTTCAGGAAACAAAAATTTGTGCTATGCAAATA
CAATAAACTGGAAAAAACTGTTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACCAAAATTATA
AGCAACAGAGGTGAAAACAGCTGCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTT
GTGCTCCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCGGAGCCCAGGGACTGCGTCTCTTGCCG
GAATGTCAGCCGAGGCAGGGAATGCGTGGACAAGTGCAACCTTCTGGAGGGTG
AGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGTGCATACAGTGCCACCCAGAGTGC
CTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGACGGGGACCAGACAACTGTATC
CAGTGTGCCCACTACATTGACGGCCCCCACTGCGTCAAGACCTGCCCGGCAGGA
GTCATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTACGCAGACGCCGGCCATGT
GTGCCACCTGTGCCATCCAAACTGCACCTACGGATGCACTGGGCCAGGTCTTGA
AGGCTGTCCAACGAATGGGCCTAAGATCCCGTCCATCGCCACTGGGATGGTGGG
GGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTGGTGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCATGTGA
GCGGCCGCTCTAGACCCGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATAATC
AACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGC
TCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTT
CCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTAT
GAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCT
GACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGG
ACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTG
CCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTGT
CGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCT
GCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCT
TCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTC
AGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCATCGATACCGTCGACTAG
CCGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTT
AAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACTCCCAAAGAAGACAAGATC
TGCTTTTTGCCTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCT
CTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGT
GCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTC
AGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGAATTCGATATCAAGCTTAT
CGATACCGTCGACCTCGAGGGGGGGCCCGGTACCCAATTCGCCCTATAGTGAGT
CGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTG
GCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAA
TAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGG
CGAATGGAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTT
AAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAAT
CAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGGAACAAGAGT

CCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCA
GGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAG
GTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCCGATTTAGAGCTTG
ACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGA
GCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTAACCACCAC
ACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCAGGTGGCACTTTTCGGGG
AAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTAT
CCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAG
AGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTG
CCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGA
TCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGAT
CCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTT
CTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGT
CGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAA
AAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACC
ATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAA
GGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCG
TTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGA
TGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTA
CTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAG
GACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGG
AGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAA
GCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGA
ACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACT
GTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAA
TTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTT
AACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGAT
CTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACC
ACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCG
AAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAG
CCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCT
CTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCG
GGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACG
GGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAG
ATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGG
CGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGA
GCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTC
TGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAA
AACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTC
ACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTT
GAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGT
GAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTT
GGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCA
GTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTT
TACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATT
TCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCGAAATTAACCCTCA
CTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCTCGAGGTCGAGA

TCCGGTCGACCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTA
ACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTA
TGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAG
GCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTCGACGGTATCGATTGGCTCA
TGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAAT
CAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAAC
TTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGT
CAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTC
AATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATC
ATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGC
ATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGT
ATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCG
TGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAA
TGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAA
CTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGAATTCGGAGTGGCG
AGCCCTCAGATCCTGCATATAAGCAGCTGCTTTTTGCCTGTACTGGGTCTCTCTG

Tabella 18

Leader RII -Cerniera-CH3- CD28tm/41BB-Z-T2A-tEGFR (SEQ ID NO:46)

Leader

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP

scFV R11

QSVKESEGDLVTPAGNLTLTCTASGSDINDYPISWVRQAPGKGLEWIGFINSGGSTW
YASWVKGRFTISRTSTTVDLKMTSLTTDDTATYFCARGYSTYYGDFNIWGPGTLVT
ISSGGGGSGGGGSGGGGSELVMTQTPSSTSGAVGGTVTINCQASQSIDSNLAWFQQ
KPGQPPTLLIYRASNLASGVPSRFSGSRSGTEYTLTISGVQREDAATYYCLGGVGNV
SYRTSFGGGTEVVVK

Cerniera/distanziatore

ESKYGPPCPPCP

CH3

GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

CD28tm

MFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV

4-1BB

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

CD3zeta

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP
QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ
ALPPR

T2A

LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPRM

tEGFR

LLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHIL
PVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTK
QHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKT
KIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEG
EPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMG
ENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPKIPSIATGMVGALLL
LLVVALGIGLFM

Tabella 19

CAR con distanziatore corto R11: PJ_Rl 1- 41BB-Z-T2A-tEGFR(SEQ ID NO:47)

GTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCT
TAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTG
TGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATC
TCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAG
CTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAGGG
GCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGA
GAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGATGGGA
AAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAAGAAAAAATATAAATTAAAACATATAG
TATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAA
CATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACA
GGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTG
CATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGA
AGAGCAAAACAAAAGTAAGAAAAAAGCACAGCAAGCAGCAGCTGACACAGGA
CACAGCAATCAGGTCAGCCAAAATTACCCTATAGTGCAGAACATCCAGGGGCA
AATGGTACATCAGGCCATATCACCTAGAACTTTAAATGCATGGGTAAAAGTAGT
AGAAGAGAAGGCTTTCAGCCCAGAAGTGATACCCATGTTTTCAGCATTATCAGA
AGGAGCCACCCCACAAGATTTAAACACCATGCTAAACACAGTGGGGGGACATC
AAGCAGCCATGCAAATGTTAAAAGAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGGCAAA
GAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCC
TTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTG
ACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTG
CTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATC
AAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACA
GCTCCTGGGGATTTGGGGTTGCTCTGGAAAACTCATTTGCACCACTGCTGTGCCT
TGGATCTACAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTG
GGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAA
ACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTAC
AGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGGGATCAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGG
GTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGAGGATCTGCGATCGCTCCGGTGCCCGTCA
GTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGGAGGGGTCG
GCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGAT
GTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGT
GCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAG
CTGAAGCTTCGAGGGGCTCGCATCTCTCCTTCACGCGCCCGCCGCCCTACCTGA
GGCCGCCATCCACGCCGGTTGAGTCGCGTTCTGCCGCCTCCCGCCTGTGGTGCC
TCCTGAACTGCGTCCGCCGTCTAGGTAAGTTTAAAGCTCAGGTCGAGACCGGGC
CTTTGTCCGGCGCTCCCTTGGAGCCTACCTAGACTCAGCCGGCTCTCCACGCTTT
GCCTGACCCTGCTTGCTCAACTCTACGTCTTTGTTTCGTTTTCTGTTCTGCGCCGT
TACAGATCCAAGCTGTGACCGGCGCCTACG
GCTAGC

scFV R11

GAATTCGCCACCATGCTGCTGCTGGTGACAAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCC
CACCCCGCCTTTCTGCTGATCCCCCAGAGCGTGAAAGAGTCCGAGGGCGACCTG

GTCACACCAGCCGGCAACCTGACCCTGACCTGTACCGCCAGCGGCAGCGACATC
AACGACTACCCCATCTCTTGGGTCCGCCAGGCTCCTGGCAAGGGACTGGAATGG
ATCGGCTTCATCAACAGCGGCGGCAGCACTTGGTACGCCAGCTGGGTCAAAGGC
CGGTTCACCATCAGCCGGACCAGCACCACCGTGGACCTGAAGATGACAAGCCT
GACCACCGACGACACCGCCACCTACTTTTGCGCCAGAGGCTACAGCACCTACTA
CGGCGACTTCAACATCTGGGGCCCTGGCACCCTGGTCACAATCTCTAGCGGCGG
AGGCGGCAGCGGAGGTGGAGGAAGTGGCGGCGGAGGATCCGAGCTGGTCATGA
CCCAGACCCCCAGCAGCACATCTGGCGCCGTGGGCGGCACCGTGACCATCAATT
GCCAGGCCAGCCAGAGCATCGACAGCAACCTGGCCTGGTTCCAGCAGAAGCCC
GGCCAGCCCCCCACCCTGCTGATCTACAGAGCCTCCAACCTGGCCAGCGGCGTG
CCAAGCAGATTCAGCGGCAGCAGATCTGGCACCGAGTACACCCTGACCATCTCC
GGCGTGCAGAGAGAGGACGCCGCTACCTATTACTGCCTGGGCGGCGTGGGCAA
CGTGTCCTACAGAACCAGCTTCGGCGGAGGTACTGAGGTGGTCGTCAAA

Cerniera/Distanziatore

TACGGACCGCCCTGCCCCCCTTGCCCT

GGCCAGCCTCGCGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCTCCCTCCCAGGAAGAGATG
ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGAC
ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCAC
CCCTCCCGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCCGGCTGACCGT
GGACAAGAGCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTCTTTAGCTGCAGCGTGATGCACG
AGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAG

4-1BB

ATGTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTGGGCGGGGTGCTGGCCTGCTACAGCCTGCTG
GTGACAGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTGAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTG
TATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGAT
GGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG

CD3zeta

CGGGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCGACGCCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAA
TCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGAAGGGAAGAGTACGACGTCCTGG
ATAAGCGGAGAGGCCGGGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCTCGGCGGAAGAAC
CCCCAGGAAGGCCTGTATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTA
CAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGGCGGGGCAAGGGCCACGACGGC
CTGTATCAGGGCCTGTCCACCGCCACCAAGGATACCTACGACGCCCTGCACATG
CAGGCCCTGCCCCCAAGG

T2A

CTCGAGGGCGGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGA
GGAGAATCCCGGCCCTAGG

tEGFR

ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCC
TCCTGATCCCACGCAAAGTGTGTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACT
CACTCTCCATAAATGCTACGAATATTAAACACTTCAAAAACTGCACCTCCATCA
GTGGCGATCTCCACATCCTGCCGGTGGCATTTAGGGGTGACTCCTTCACACATA
CTCCTCCTCTGGATCCACAGGAACTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCA
CAGGGTTTTTGCTGATTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCCT
TTGAGAACCTAGAAATCATACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTC

TTGCAGTCGTCAGCCTGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGA
TAAGTGATGGAGATGTGATAATTTCAGGAAACAAAAATTTGTGCTATGCAAATA
CAATAAACTGGAAAAAACTGTTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACCAAAATTATA
AGCAACAGAGGTGAAAACAGCTGCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTT
GTGCTCCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCGGAGCCCAGGGACTGCGTCTCTTGCCG
GAATGTCAGCCGAGGCAGGGAATGCGTGGACAAGTGCAACCTTCTGGAGGGTG
AGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGTGCATACAGTGCCACCCAGAGTGC
CTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGACGGGGACCAGACAACTGTATC
CAGTGTGCCCACTACATTGACGGCCCCCACTGCGTCAAGACCTGCCCGGCAGGA
GTCATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTACGCAGACGCCGGCCATGT
GTGCCACCTGTGCCATCCAAACTGCACCTACGGATGCACTGGGCCAGGTCTTGA
AGGCTGTCCAACGAATGGGCCTAAGATCCCGTCCATCGCCACTGGGATGGTGGG
GGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTGGTGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCATGTGA
GCGGCCGCTCTAGACCCGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATAATC
AACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGC
TCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTT
CCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTAT
GAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCT
GACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGG
ACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTG
CCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTGT
CGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCT
GCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCT
TCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTC
AGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCATCGATACCGTCGACTAG
CCGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTT
AAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACTCCCAAAGAAGACAAGATC
TGCTTTTTGCCTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCT
CTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGT
GCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTC
AGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGAATTCGATATCAAGCTTAT
CGATACCGTCGACCTCGAGGGGGGGCCCGGTACCCAATTCGCCCTATAGTGAGT
CGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTG
GCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAA
TAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGG
CGAATGGAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTT
AAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAAT
CAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGGAACAAGAGT
CCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCA
GGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAG
GTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCCGATTTAGAGCTTG
ACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGA
GCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTAACCACCAC
ACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCAGGTGGCACTTTTCGGGG
AAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTAT
CCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAG
AGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTG

CCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGA
TCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGAT
CCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTT
CTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGT
CGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAA
AAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACC
ATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAA
GGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCG
TTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGA
TGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTA
CTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAG
GACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGG
AGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAA
GCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGA
ACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACT
GTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAA
TTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTT
AACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGAT
CTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACC
ACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCG
AAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAG
CCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCT
CTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCG
GGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACG
GGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAG
ATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGG
CGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGA
GCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTC
TGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAA
AACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTC
ACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTT
GAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGT
GAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTT
GGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCA
GTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTT
TACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATT
TCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCGAAATTAACCCTCA
CTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCTCGAGGTCGAGA
TCCGGTCGACCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTA
ACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTA
TGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAG
GCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTCGACGGTATCGATTGGCTCA
TGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAAT
CAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAAC
TTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGT
CAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTC
AATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATC

ATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGC
ATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGT
ATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCG
TGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAA
TGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAA
CTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGAATTCGGAGTGGCG
AGCCCTCAGATCCTGCATATAAGCAGCTGCTTTTTGCCTGTACTGGGTCTCTCTG

Tabella 20

Leader RII -Cerniera-CD28tm/41BB-Z-T2A-tEGFR (SEQ IDNO:48)

Leader

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP

ScFv R11

QSVKESEGDLVTPAGNLTLTCTASGSDINDYPISWVRQAPGKGLEWIGFINSGGSTW
YASWVKGRFTISRTSTTVDLKMTSLTTDDTATYFCARGYSTYYGDFNIWGPGTLVT
ISSGGGGSGGGGSGGGGSELVMTQTPSSTSGAVGGTVTINCQASQSIDSNLAWFQQ
KPGQPPTLLIYRASNLASGVPSRFSGSRSGTEYTLTISGVQREDAATYYCLGGVGNV
SYRTSFGGGTEVVVK

Distanziatore/cerniera

ESKYGPPCPPCP

CD28tm

MFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV

4-1BB

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

CD3zeta

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP
QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ
ALPPR

T2A

LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR

tEGFR

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHI
LPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRT
KQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQK
TKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLE
GEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVM
GENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPKIPSIATGMVGALL
LLLVVALGIGLFM

Tabella 21

Distanziatore intermedio (SEQ IDNO:49)
Cerniera/distanziatore

ESKYGPPCPPCP

CH3

GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP

VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

Distanziatore lungo (SEQ ID NO:50)
Cerniera

ESKYGPPCPPCP

CH2

APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN

AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK

CH3

GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP

VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

Tabella 22 Costrutto Her2-distanziatore corto (SEQ Id No:54)

GMCSFss-Her2scFv-IgG4hinge-CD28tm-41BB-Zeta-T2A-EGFRt

Leader

Atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacacccagcattcctcctgatccca

Her2scFV

gatatccagatgacccagtccccgagctccctgtccgcctctgtgggcgatagggtcaccatcacctgccgtgccagtcaggatgtg
aatactgctgtagcctggtatcaacagaaaccaggaaaagctccgaaactactgatttactcggcatccttcctctactctggagtccct
tctcgcttctctggttccagatctgggacggatttcactctgaccatcagcagtctgcagccggaagacttcgcaacttattactgtcag
caacattatactactcctcccacgttcggacagggtaccaaggtggagatcaaaggcagtactagcggcggtggctccgggggcg
gatccggtgggggcggcagcagcgaggttcagctggtggagtctggcggtggcctggtgcagccaggggctcactccgtttgtc
ctgtgcagcttctggcttcaacattaaagacacctatatacactgggtgcgtcaggccccgggtaagggcctggaatgggttgcaag
gatttatcctacgaatggttatactagatatgccgatagcgtcaagggccgtttcactataagcgcagacacatccaaaaacacagcct
acctgcagatgaacagcctgcgtgctgaggacactgccgtctattattgttctagatggggaggggacggcttctatgctatggacta
ctggggtcaaggaaccctggtcaccgtctcgagt

Cerniera distanziatore

Gagagcaagtacggaccgccctgccccccttgccct

CD28tm

atgttctgggtgctggtggtggtcggaggcgtgctggcctgctacagcctgctggtcaccgtggccttcatcatcttttgggtg

4-1BB

Aaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagc
tgccgatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaactg

CD3 zeta

Cgggtgaagttcagcagaagcgccgacgcccctgcctaccagcagggccagaatcagctgtacaacgagctgaacctgggcag
aagggaagagtacgacgtcctggataagcggagaggccgggaccctgagatgggcggcaagcctcggcggaagaacccccag
gaaggcctgtataacgaactgcagaaagacaagatggccgaggcctacagcgagatcggcatgaagggcgagcggaggcggg
gcaagggccacgacggcctgtatcagggcctgtccaccgccaccaaggatacctacgacgccctgcacatgcaggccctgcccc
caagg

T2A

Ctcgagggcggcggagagggcagaggaagtcttctaacatgcggtgacgtggaggagaatcccggccctagg

tEGFR

atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacacccagcattcctcctgatcccacgcaaagtgtgtaacggaataggt
attggtgaatttaaagactcactctccataaatgctacgaatattaaacacttcaaaaactgcacctccatcagtggcgatctccacatcc
tgccggtggcatttaggggtgactccttcacacatactcctcctctggatccacaggaactggatattctgaaaaccgtaaaggaaatc
acagggtttttgctgattcaggcttggcctgaaaacaggacggacctccatgcctttgagaacctagaaatcatacgcggcaggacc
aagcaacatggtcagttttctcttgcagtcgtcagcctgaacataacatccttgggattacgctccctcaaggagataagtgatggaga
tgtgataatttcaggaaacaaaaatttgtgctatgcaaatacaataaactggaaaaaactgtttgggacctccggtcagaaaaccaaaa
ttataagcaacagaggtgaaaacagctgcaaggccacaggccaggtctgccatgccttgtgctcccccgagggctgctggggccc
ggagcccagggactgcgtctcttgccggaatgtcagccgaggcagggaatgcgtggacaagtgcaaccttctggagggtgagcc
aagggagtttgtggagaactctgagtgcatacagtgccacccagagtgcctgcctcaggccatgaacatcacctgcacaggacgg
ggaccagacaactgtatccagtgtgcccactacattgacggccccccactgcgtcaagacctgcccggcaggagtcatgggagaaa
acaacaccctggtctggaagtacgcagacgccggccatgtgtgccacctgtgccatccaaactgcacctacggatgcactgggcca
ggtcttgaaggctgtccaacgaatgggcctaagatcccgtccatcgccactgggatggtgggggccctcctcttgctgctggtggtg
gccctggggatcggcctcttcatgtga

Tabella 23

Costrutto Her2-distanziatore corto (SEQ Id No:55)

Leader

Atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacaccca

Her2scFv

Gcattcctcctgatcccagatatccagatgacccagtccccgagctccctgtccgcctctgtgggcgatagggtcaccatcacctgc
cgtgccagtcaggatgtgaatactgctgtagcctggtatcaacagaaaccaggaaaagctccgaaactactgatttactcggcatcct
tcctctactctggagtcccttctcgcttctctggttccagatctgggacggatttcactctgaccatcagcagtctgcagccggaagactt
cgcaacttattactgtcagcaacattatactactcctcccacgttcggacagggtaccaaggtggagatcaaaggcagtactagcggc
ggtggctccgggggcggatccggtgggggcggcagcagcgaggttcagctggtggagtctggcggtggcctggtgcagccagg
gggctcactccgtttgtcctgtgcagcttctggcttcaacattaaagacacctatatacactgggtgcgtcaggccccgggtaagggc
ctggaatgggttgcaaggatttatcctacgaatggttatactagatatgccgatagcgtcaagggccgtttcactataagcgcagacac
atccaaaaacacagcctacctgcagatgaacagcctgcgtgctgaggacactgccgtctattattgttctagatggggaggggacgg
cttctatgctatggactactggggtcaaggaaccctggtcaccgtctcgagt

Cerniera distanziatore

GagagcaagtacggaccgccctgccccccttgccctGgccagcctagagaaccccaggtgtacaccctgcctcccagccagga
agagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgcctggtcaaaggcttctaccccagcgatatcgccgtggaatgggagagcaac
ggccagcccgagaacaactacaagaccacccccccctgtgctggacagcgacggcagcttcttcctgtactcccggctgaccgtgg
acaagagccggtggcaggaaggcaacgtcttcagctgcagcgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacacccagaagtccc
tgagcctgagcctgggcaag

CD28tm

Atgttctgggtgctggtggtggtcggaggcgtgctggcctgctacagcctgctggtcaccgtggccttcatcatcttttgggtg

4-1BB

Aaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagc
tgccgatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaactg

CD3 zeta

Cgggtgaagttcagcagaagcgccgacgcccctgcctaccagcagggccagaatcagctgtacaacgagctgaacctgggcag
aagggaagagtacgacgtcctggataagcggagaggccgggaccctgagatgggcggcaagcctcggcggaagaacccccag
gaaggcctgtataacgaactgcagaaagacaagatggccgaggcctacagcgagatcggcatgaagggcgagcggaggcgggg
gcaagggccacgacggcctgtatcagggcctgtccaccgccaccaaggatacctacgacgccctgcacatgcaggccctgcccc
caagg

T2A

Ctcgagggcggcggagagggcagaggaagtcttctaacatgcggtgacgtggaggagaatcccggccctagg

tEGFR

atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacacccagcattcctcctgatcccacgcaaagtgtgtaacggaataggt
attggtgaatttaaagactcactctccataaatgctacgaatattaaacacttcaaaaactgcacctccatcagtggcgatctccacatcc
tgccggtggcatttaggggtgactccttcacacatactcctcctctggatccacaggaactggatattctgaaaaccgtaaaggaaatc
acagggtttttgctgattcaggcttggcctgaaaacaggacggacctccatgcctttgagaacctagaaatcatacgcggcaggacc
aagcaacatggtcagttttctcttgcagtcgtcagcctgaacataacatccttgggattacgctcccctcaaggagataagtgatggaga
tgtgataatttcaggaaacaaaaatttgtgctatgcaaatacaataaactggaaaaaactgtttgggacctccggtcagaaaaccaaaa
ttataagcaacagaggtgaaaacagctgcaaggccacaggccaggtctgccatgccttgtgctcccccgagggctgctggggccc
ggagcccagggactgcgtctcttgccggaatgtcagccgaggcagggaatgcgtggacaagtgcaaccttctggagggtgagcc
aagggagtttgtggagaactctgagtgcatacagtgccacccagagtgcctgcctcaggccatgaacatcacctgcacaggacgg
ggaccagacaactgtatccagtgtgcccactacattgacggccccccactgcgtcaagacctgcccggcaggagtcatgggagaaa
acaacaccctggtctggaagtacgcagacgccggccatgtgtgccacctgtgccatccaaactgcacctacggatgcactgggcca
ggtcttgaaggctgtccaacgaatgggcctaagatcccgtccatcgccactgggatggtgggggccctcctcttgctgctggtggtg
gccctggggatcggcctcttcatgtga

Tabella 24
Costrutto Her2-distanziatore lungo (SEQ Id No:56)

leader
Atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacaccca
Her2scFV
gcattcctcctgatcccagatatccagatgacccagtccccgagctccctgtccgcctctgtgggcgataggg tcaccatcacctgcc
gtgccagtcaggatgtgaatactgctgtagcctggtatcaacagaaaccaggaaaagctccgaaactactgatttactcggcatcctt
cctctactctggagtcccttctcgcttctctggttccagatctgggacggatttcactctgaccatcagcagtctgcagccggaagactt
cgcaacttattactgtcagcaacattatactactcctcccacgttcggacagggtaccaaggtggagatcaaaggcagtactagcggc
ggtggctccgggggcggatccggtgggggcggcagcagcgaggttcagctggtggagtctggcggtggcctggtgcagccagg
gggctcactccgtttgtcctgtgcagcttctggcttcaacattaaagacacctatatacactgggtgcgtcaggccccgggtaagggc
ctggaatgggttgcaaggatttatcctacgaatggttatactagatatgccgatagcgtcaagggccgtttcactataagcgcagacac
atccaaaaacacagcctacctgcagatgaacagcctgcgtgctgaggacactgccgtctattattgttctagatggggaggggacgg
cttctatgctatggactactggggtcaaggaaccctggtcaccgtctcgagt
Distanziatore lungo
gagagcaagtacggaccgccctgccccccttgccctgcccccgagttcctgggcggacccagcgtgttcctgttccccccaagcc
caaggacaccctgatgatcagccggacccccgaggtgacctgcgtggtggtggacgtgagccaggaagatcccgaggtccagtt
caattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcccagagaggaacagttcaacagcacctaccgggtggt
gtctgtgctgaccgtgctgcaccaggactggctgaacggcaaagaatacaagtgcaaggtgtccaacaagggcctgcccagcagc
atcgaaaagaccatcagcaaggccaagggccagcctcgcgagccccaggtgtacaccctgcctcccctcccaggaagagatgacc
aagaaccaggtgtccctgacctgcctggtgaagggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaacggccagcct
gagaacaactacaagaccaccccctcccgtgctggacagcgacggcagcttcttcctgtacagccggctgaccgtggacaagagcc
ggtggcaggaaggcaacgtctttagctgcagcgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacacccagaagagcctgagcctgtc
cctgggcaag
CD28tm
atgttctgggtgctggtggtggtgggcggggtgctggcctgctacagcctgctggtgacagtggccttcatcatcttttgggtg
4-1BB
aaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagct
gccgatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaactg
CD3zeta
Cgggtgaagttcagcagaagcgccgacgcccctgcctaccagcagggccagaatcagctgtacaacgagctgaacctgggcag
aagggaagagtacgacgtcctggataagcggagaggccgggaccctgagatgggcggcaagcctcggcggaagaacccccag
gaaggcctgtataacgaactgcagaaagacaagatggccgaggcctacagcgagatcggcatgaagggcgagcggaggcggg
gcaagggccacgacggcctgtatcagggcctgtccaccgccaccaaggatacctacgacgccctgcacatgcaggccctgcccc
caagg
T2A
Ctcgagggcggcggagagggcagaggaagtcttctaacatgcggtgacgtggaggagaatcccggccctagg
tEGFR
atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacacccagcattcctcctgatcccacgcaaagtgtgtaacggaataggt
attggtgaatttaaagactcactctccataaatgctacgaatattaaacacttcaaaaactgcacctccatcagtggcgatctccacatcc
tgccggtggcatttaggggtgactccttcacacatactcctcctctggatccacaggaactggatattctgaaaaccgtaaaggaaatc
acagggtttttgctgattcaggcttggcctgaaaacaggacggacctccatgcctttgagaacctagaaatcatacgcggcaggacc
aagcaacatggtcagttttctcttgcagtcgtcagcctgaacataacatccttgggattacgctccctcaaggagataagtgatggaga
tgtgataatttcaggaaacaaaaatttgtgctatgcaaatacaataaactggaaaaaactgtttgggacctccggtcagaaaaccaaaa
ttataagcaacagaggtgaaaacagctgcaaggccacaggccaggtctgccatgccttgtgctccccgagggctgctggggccc
ggagcccagggactgcgtctcttgccggaatgtcagccgaggcagggaatgcgtggacaagtgcaaccttctggagggtgagcc
aagggagtttgtggagaactctgagtgcatacagtgccacccagagtgcctgcctcaggccatgaacatcacctgcacaggacgg

ggaccagacaactgtatccagtgtgcccactacattgacggcccccactgcgtcaagacctgcccggcaggagtcatgggagaaa
acaacaccctggtctggaagtacgcagacgccggccatgtgtgccacctgtgccatccaaactgcacctacggatgcactgggcca
ggtcttgaaggctgtccaacgaatgggcctaagatcccgtccatcgccactgggatggtgggggccctcctcttgctgctggtggtg
gccctggggatcggcctcttcatgtga

RIVENDICAZIONI

1. Un acido nucleico di recettore chimerico comprendente:

a) un polinucleotide codificante un dominio legante il ligando, in cui il dominio legante il ligando si lega a un ligando, in cui il ligando è una molecola specifica per tumore, una molecola virale o qualsiasi altra molecola espressa su una popolazione di cellule bersaglio che è adatta a mediare il riconoscimento e l'eliminazione da parte di un linfocita, in cui il polinucleotide codifica una singola catena Fv avente la sequenza amminoacidica

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPS
RFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEG
STKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSE
TTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQG
TSVTVSS

che lega specificamente CD19;

b) un polinucleotide codificante un distanziatore polipeptidico di una lunghezza che è specifica per il ligando, in cui il distanziatore fornisce una maggiore proliferazione delle cellule T e/o la produzione di citochine in risposta al ligando rispetto a un recettore chimerico di riferimento, in cui il distanziatore ha una lunghezza di 15 amminoacidi o inferiore e comprende la sequenza amminoacidica

ESKYGPPCPPCP;

c) un polinucleotide codificante un dominio transmembrana, in cui il dominio transmembrana comprende la sequenza amminoacidica MFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV di un dominio transmembrana CD28; e

d) un polinucleotide codificante un dominio di segnalazione intracellulare, in cui il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare 4-1BB e un dominio di segnalazione di CD3zeta, avente la sequenza amminoacidica
KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQ NQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR.

2. L'acido nucleico di recettore chimerico secondo la rivendicazione 1, in cui la regione distanziatrice ha una lunghezza di 12 amminoacidi.

3. L'acido nucleico di recettore chimerico secondo la rivendicazione 1 o 2, comprendente inoltre un acido nucleico che codifica una sequenza di marcatore.

4. L'acido nucleico di recettore chimerico secondo la

rivendicazione 3, in cui la sequenza di marcatore è un recettore troncato del fattore di crescita epidermico avente la sequenza amminoacidica

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPV
AFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQ
FSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGEN
SCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECI
QCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADA
GHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM.

5. L'acido nucleico di recettore chimerico secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 3 a 4, in cui il polinucleotide codificante la sequenza di marcatore è operativamente collegato a un polinucleotide codificante una sequenza linker clivabile, facoltativamente in cui la sequenza linker clivabile ha la sequenza amminoacidica LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR. .

6. L'acido nucleico di recettore chimerico secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5, in cui:

a) l'acido nucleico di recettore chimerico comprende le sequenze di SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 e SEQ ID NO:9 e/o

b) l'acido nucleico di recettore chimerico codifica un

polipeptide avente la sequenza amminoacidica

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQK
PDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGG
GTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVS
WIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYY
CAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSESKYGPPCPPCPMFWVLVVVGGVLACYSLLV
TVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSAD
APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK
MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRLEGGGEGRGSL
LTCGDVEENPGPRMLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFK
NCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFEN
LEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTS
GQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLE
GEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGE
NNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPKIPSIATGMVGALLLLLVV
ALGIGLFM.

7. Un vettore di espressione comprendente un acido nucleico di recettore chimerico isolato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6.

8. Una cellula ospite comprendente un acido nucleico secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6 o un vettore di espressione secondo la rivendicazione 7.

9. La cellula ospite secondo la rivendicazione 8, in cui la cellula ospite è una cellula di linfocita T citotossico CD8+ selezionata dal gruppo consistente di

cellule T CD8+ naïve, cellule T CD8+ memoria centrali, cellule T CD8+ memoria effettrici e cellule T CD8+ bulk; facoltativamente in cui la cellula T memoria centrale è positiva a CD45RO+, CD62L+, e CD8+.

10. La cellula ospite secondo la rivendicazione 8, in cui la cellula ospite è una cellula di linfocita T helper CD4+ selezionata dal gruppo consistente di cellule T CD4+ naïve, cellule T CD4+ memoria centrali, cellule T CD4+ memoria effettrici e cellule T CD4+ bulk; facoltativamente in cui la cellula T CD4+ naïve è positiva a CD45RA+, CD62L+ e CD4+ e negativa a CD45RO.

11. Una composizione comprendente una cellula ospite secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 8 a 10 in un eccipiente farmaceuticamente accettabile.

12. La composizione secondo la rivendicazione 11 comprendente una cellula ospite secondo la rivendicazione 9 e una cellula ospite secondo la rivendicazione 10.

13. La cellula ospite secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 8 a 10 o la composizione delle

rivendicazioni 11 o 12 per uso nel trattamento di un cancro o di un'infezione virale; facoltativamente in cui il cancro è un tumore solido o un tumore maligno ematologico.

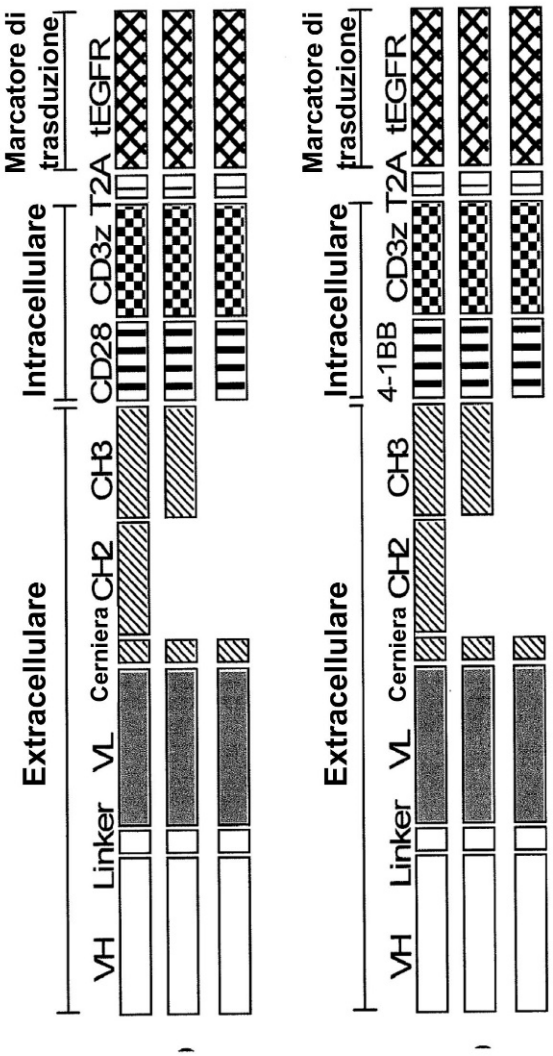

Extracellulare
Intracellulare
Marcatore di trasduzione
VH
Linker
VL
Cerniera
CH2
CH3
CD28
CD3z
T2A
tEGFR
Extracellulare
Intracellulare
Marcatore di trasduzione
VH
Linker
VL
Cerniera
CH2
CH3
4-1BB
CD3z
T2A
tEGFR

Figura 1

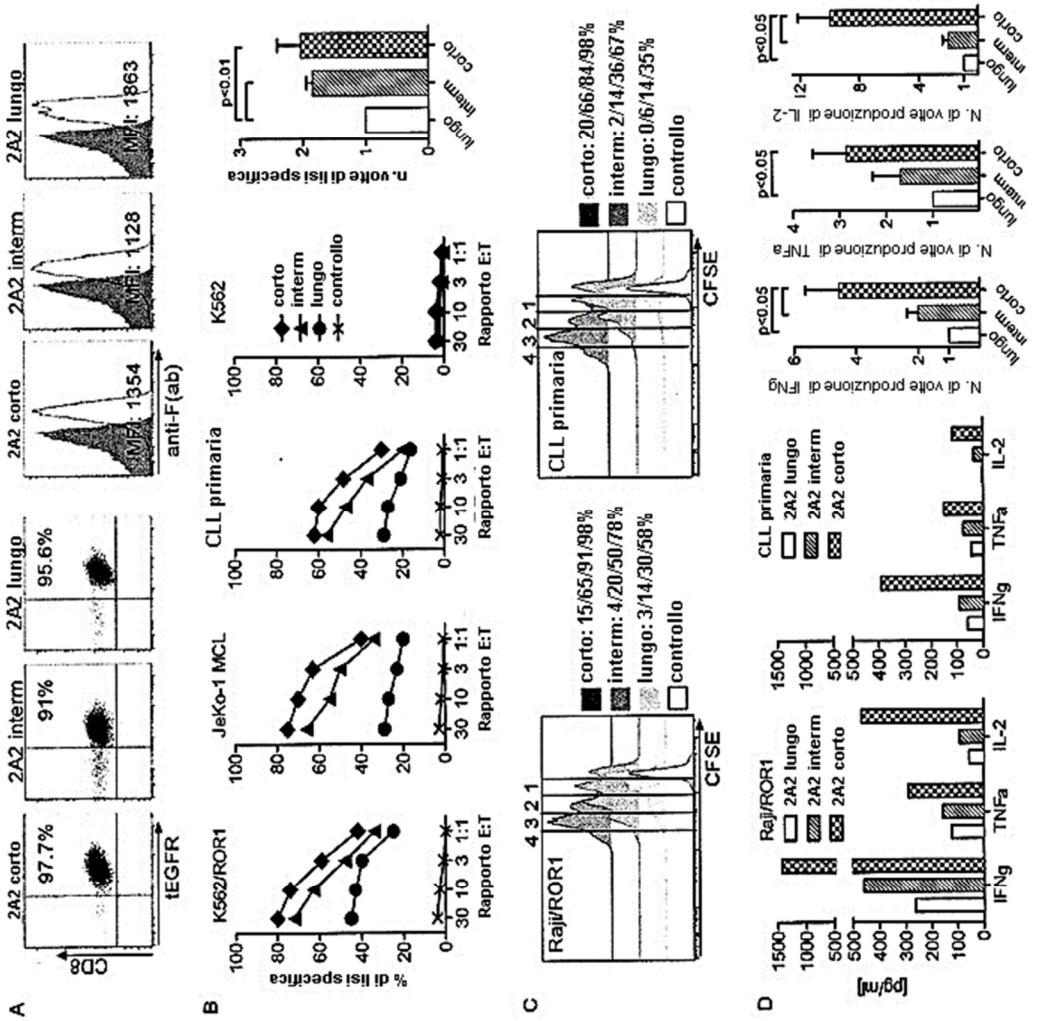
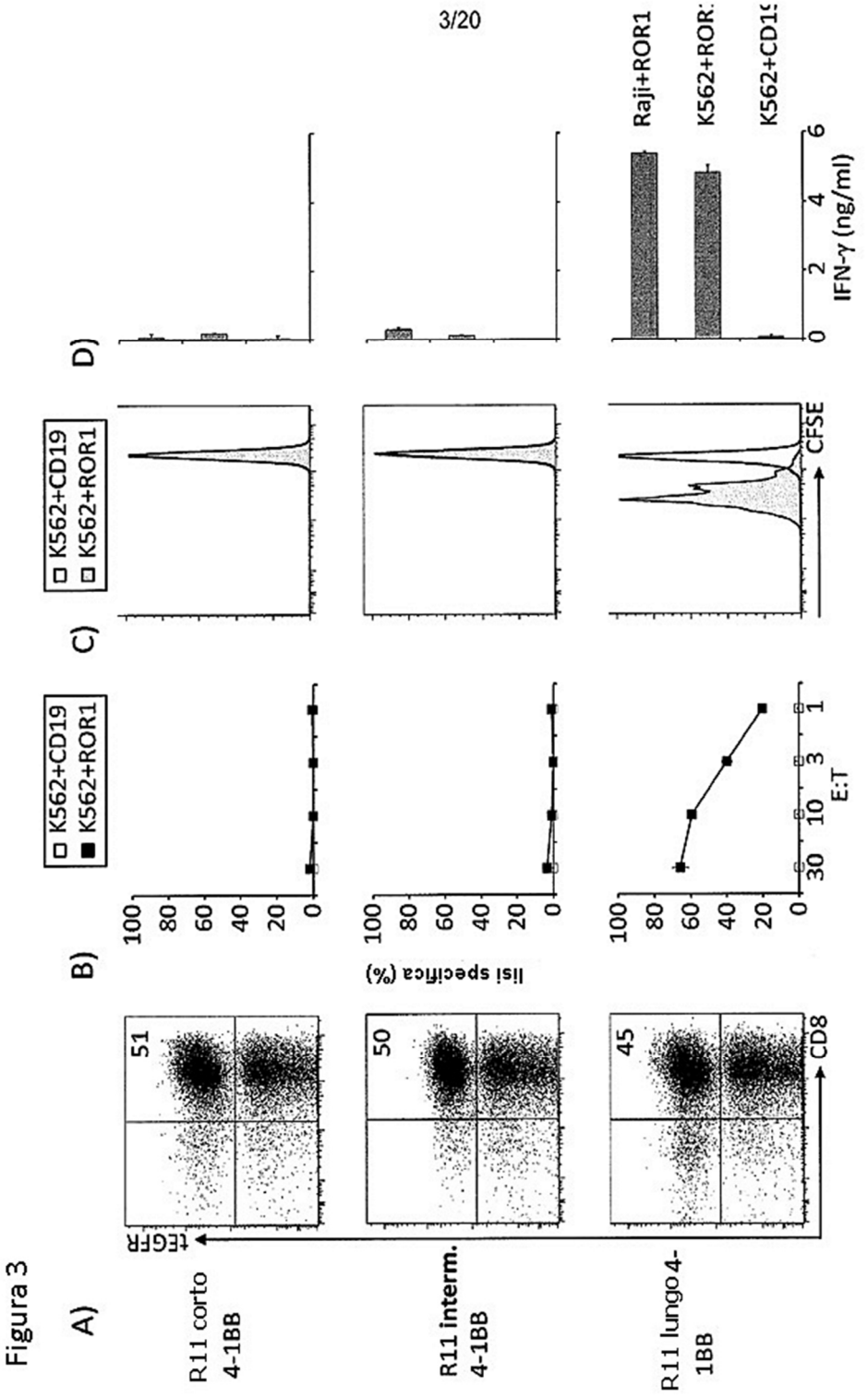

A
2A2 corto
2A2 interm
2A2 lungo
97.7%
91%
95.6%
CD8
tEGFR
anti-F(ab)
MFI: 1354
MFI: 1128
MFI: 1863
B
K562/ROR1
JeKo-1 MCL
CLL primaria
K562
% di lisi specifica
Rapporto E:T
corto
interm
lungo
controllo
n. volte di lisi specifica
p<0.01
C
Raji/ROR1
CLL primaria
CFSE
corto: 15/65/91/98%
interm: 4/20/50/78%
lungo: 3/14/30/58%
controllo
corto: 20/66/84/98%
interm: 2/14/36/67%
lungo: 0/6/14/35%
D
[pg/ml]
Raji/ROR1
CLL primaria
2A2 lungo
2A2 interm
2A2 corto
IFNg
TNFa
IL-2
N. di volte produzione di IFNg
N. di volte produzione di TNFa
N. di volte produzione di IL-2
p<0.05

Figura 2

Figura 3


A)
B)
C)
D)
R11 corto 4-1BB
R11 interm. 4-1BB
R11 lungo 4-1BB
tEGFR
CD8
51
50
45
K562+CD19
K562+ROR1
lisi specifica (%)
E:T
CFSE
Raji+ROR1
K562+ROR
K562+CD1
IFN-γ (ng/ml)
3/20

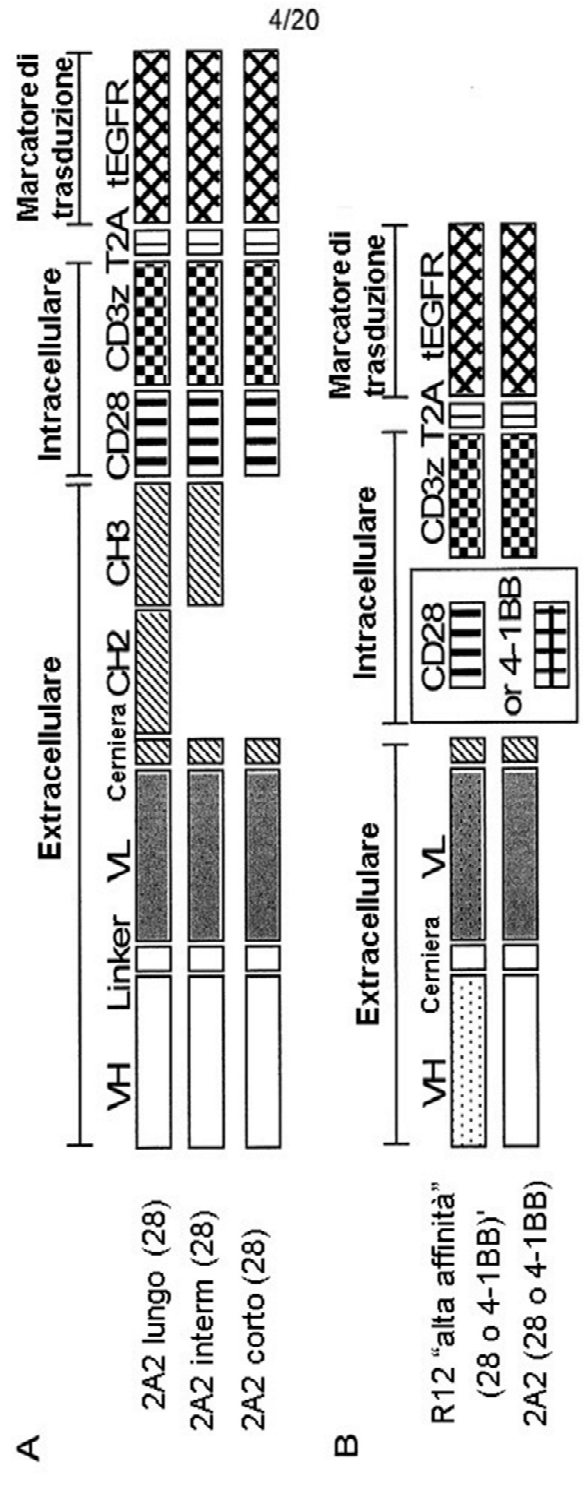
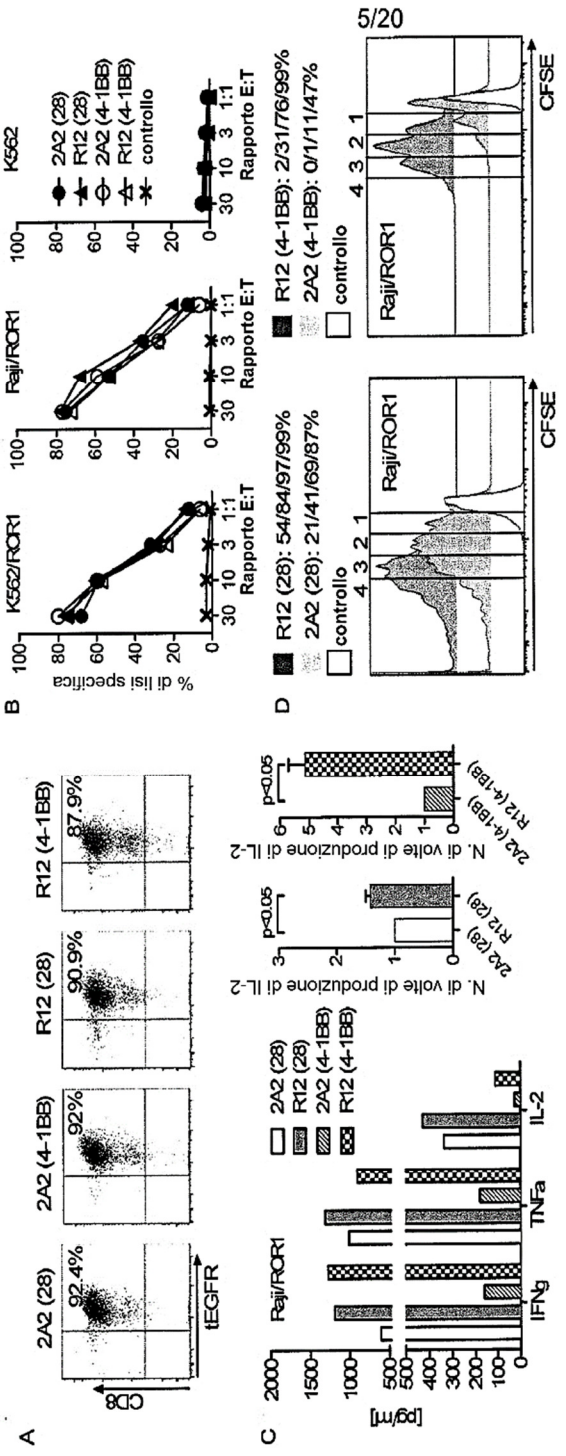

4/20
A
Extracellulare
Intracellulare
Marcatore di trasduzione
VH
Linker
VL
Cerniera
CH2
CH3
CD28
CD3z
T2A
tEGFR
2A2 lungo (28)
2A2 interm (28)
2A2 corto (28)
B
Extracellulare
Intracellulare
Marcatore di trasduzione
VH
Cerniera
VL
CD28
or 4-1BB
CD3z
T2A
tEGFR
R12 "alta affinità" (28 o 4-1BB)'
2A2 (28 o 4-1BB)

Figura 4

Figura 5


5/20
A
2A2 (28)
2A2 (4-1BB)
R12 (28)
R12 (4-1BB)
92.4%
92%
90.9%
87.9%
CD8
tEGFR
B
K562/ROR1
Raji/ROR1
K562
% di lisi specifica
Rapporto E:T
2A2 (28)
R12 (28)
2A2 (4-1BB)
R12 (4-1BB)
controllo
C
Raji/ROR1
[pg/ml]
IFNg
TNFa
IL-2
N. di volte di produzione di IL-2
p<0.05
D
R12 (28): 54/84/97/99%
2A2 (28): 21/41/69/87%
controllo
R12 (4-1BB): 2/31/76/99%
2A2 (4-1BB): 0/1/11/47%
CFSE

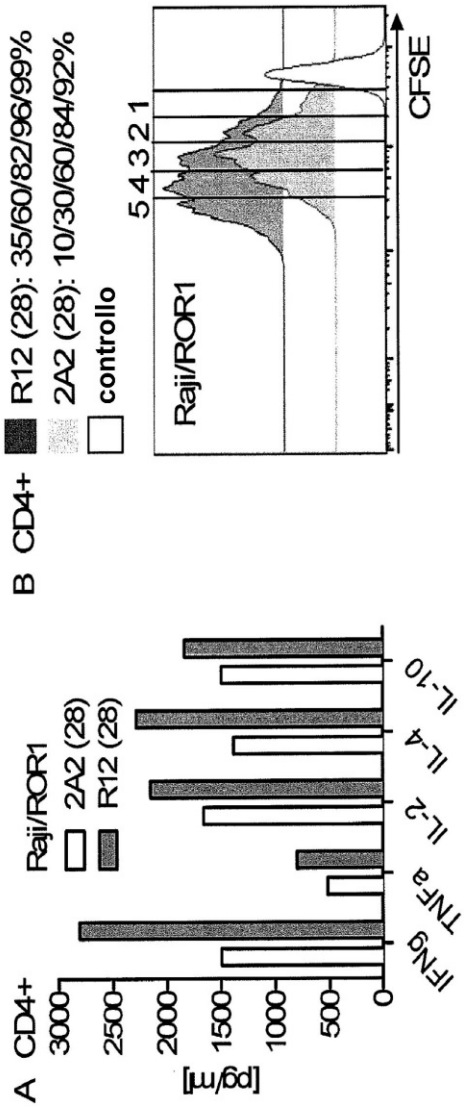

A CD4+
Raji/ROR1
2A2 (28)
R12 (28)
[pg/ml]
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
IFNg
TNFa
IL-2
IL-4
IL-10
B CD4+
R12 (28): 35/60/82/96/99%
2A2 (28): 10/30/60/84/92%
controllo
5 4 3 2 1
Raji/ROR1
CFSE

Figura 6

Figura 7

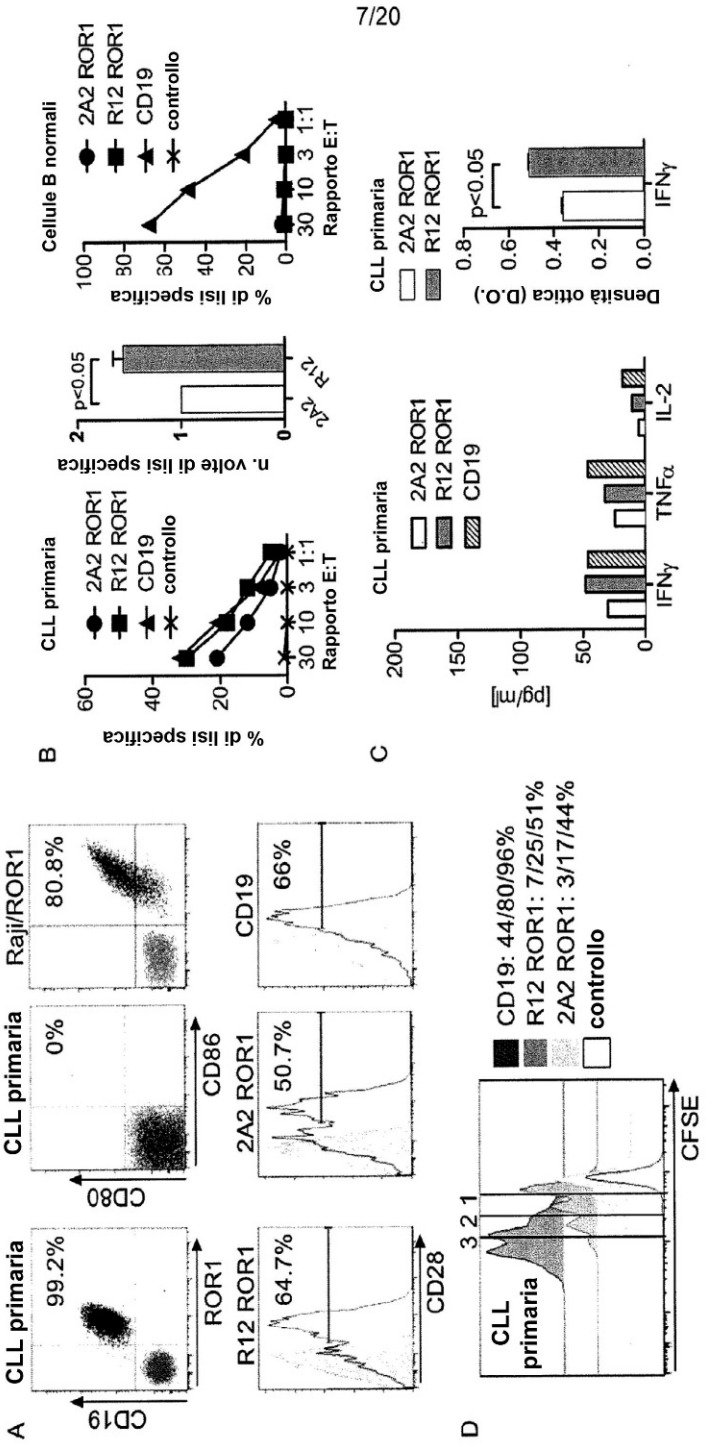

A
CLL primaria
99.2%
CD19
ROR1
R12 ROR1
64.7%
CD28
CLL primaria
0%
CD80
CD86
2A2 ROR1
50.7%
Raji/ROR1
80.8%
CD19
66%
B
CLL primaria
2A2 ROR1
R12 ROR1
CD19
controllo
% di lisi specifica
Rapporto E:T
n. volte di lisi specifica
p<0.05
Cellule B normali
C
CLL primaria
2A2 ROR1
R12 ROR1
CD19
[pg/ml]
IFNγ
TNFα
IL-2
Densità ottica (D.O.)
p<0.05
D
CD19: 44/80/96%
R12 ROR1: 7/25/51%
2A2 ROR1: 3/17/44%
controllo
CLL primaria
CFSE

Figura 8

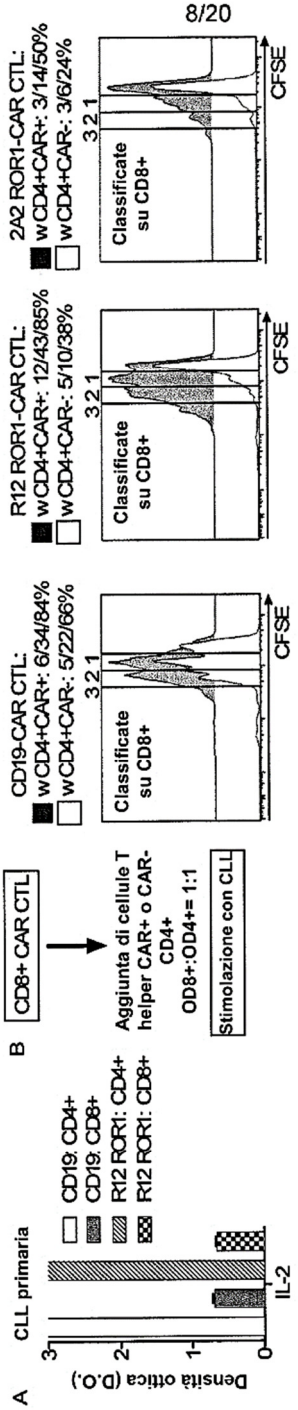
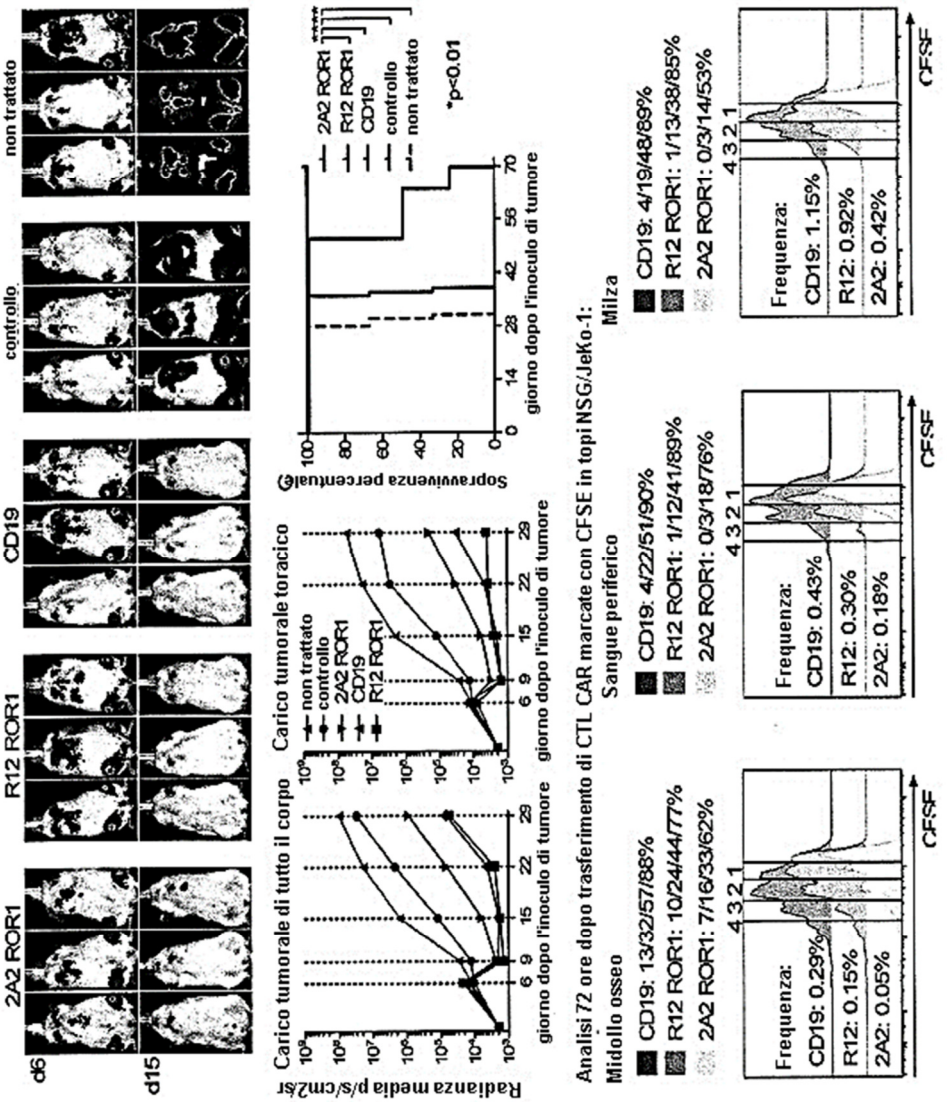

8/20
A
CLL primaria
Densità ottica (D.O.)
3
2
1
0
IL-2
CD19: CD4+
CD19: CD8+
R12 ROR1: CD4+
R12 ROR1: CD8+
B
CD8+ CAR CTL
Aggiunta di cellule T helper CAR+ o CAR- CD4+
OD8+:OD4+= 1:1
Stimolazione con CLL
CD19-CAR CTL:
wCD4+CAR+: 6/34/84%
wCD4+CAR-: 5/22/66%
R12 ROR1-CAR CTL:
wCD4+CAR+: 12/43/85%
wCD4+CAR-: 5/10/38%
2A2 ROR1-CAR CTL:
wCD4+CAR+: 3/14/50%
wCD4+CAR-: 3/6/24%
3 2 1
Classificate su CD8+
CFSE

Figura 9


A
2A2 RORI
R12 RORI
CD19
controllo
non trattato
d6
d15
B
Carico tumorale di tutto il corpo
Carico tumorale toracico
Radianza media p/s/cm2/sr
non trattato
controllo
2A2 RORI
CD19
R12 RORI
giorno dopo l'inoculo di tumore
Sopravvivenza percentuale
2A2 RORI
R12 RORI
CD19
controllo
non trattato
*p<0.01
giorno dopo l'inoculo di tumore
D
Analisi 72 ore dopo trasferimento di CTL CAR marcate con CFSE in topi NSG/JeKo-1:
Midollo osseo
CD19: 13/32/57/88%
R12 RORI: 10/24/44/77%
2A2 RORI: 7/16/33/62%
Frequenza:
CD19: 0.29%
R12: 0.15%
2A2: 0.05%
CFSF
Sangue periferico
CD19: 4/22/51/90%
R12 RORI: 1/12/41/89%
2A2 RORI: 0/3/18/76%
Frequenza:
CD19: 0.43%
R12: 0.30%
2A2: 0.18%
CFSF
Milza
CD19: 4/19/48/89%
R12 RORI: 1/13/38/85%
2A2 RORI: 0/3/14/53%
Frequenza:
CD19: 1.15%
R12: 0.92%
2A2: 0.42%
CFSF

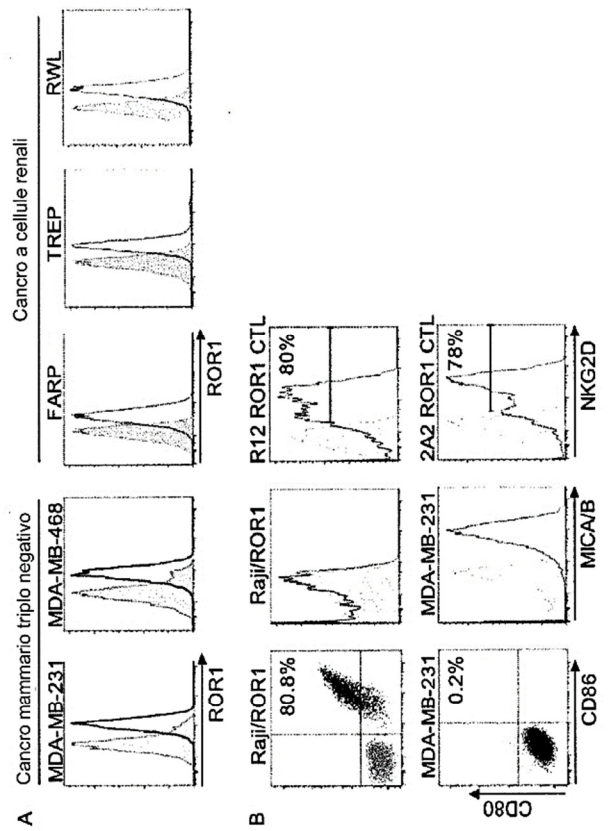

A
Cancro mammario triplo negativo
MDA-MB-231
MDA-MB-468
ROR1
Cancro a cellule renali
FARP
TREP
RWL
ROR1
B
Raji/ROR1
80.8%
CD86
Raji/ROR1
MICA/B
R12 ROR1 CTL
80%
NKG2D
MDA-MB-231
0.2%
CD80
MDA-MB-231
2A2 ROR1 CTL
78%
NKG2D

Figura 10

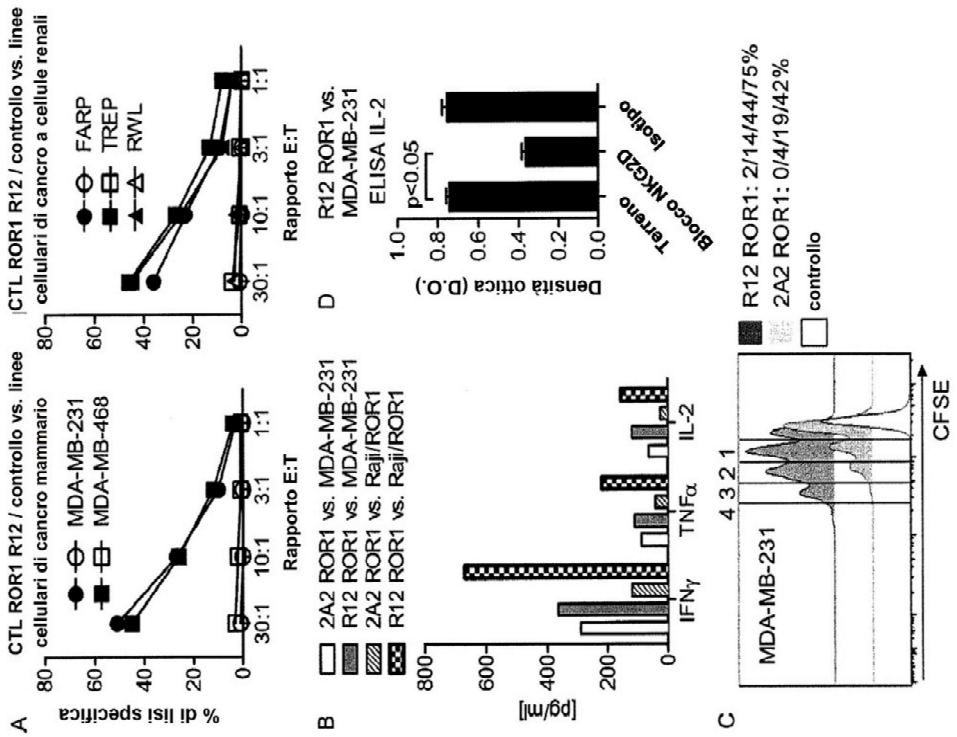

A
CTL ROR1 R12 / controllo vs. linee cellulari di cancro mammario
% di lisi specifica
MDA-MB-231
MDA-MB-468
Rapporto E:T
30:1
10:1
3:1
1:1
CTL ROR1 R12 / controllo vs. linee cellulari di cancro a cellule renali
FARP
TREP
RWL
B
2A2 ROR1 vs. MDA-MB-231
R12 ROR1 vs. MDA-MB-231
2A2 ROR1 vs. Raji/ROR1
R12 ROR1 vs. Raji/ROR1
[pg/ml]
IFNγ
TNFα
IL-2
C
MDA-MB-231
4 3 2 1
CFSE
R12 ROR1: 2/14/44/75%
2A2 ROR1: 0/4/19/42%
controllo
D
R12 ROR1 vs. MDA-MB-231
ELISA IL-2
p<0.05
Densità ottica (D.O.)
Terreno
Blocco NKG2D
Isotipo

Figura 11

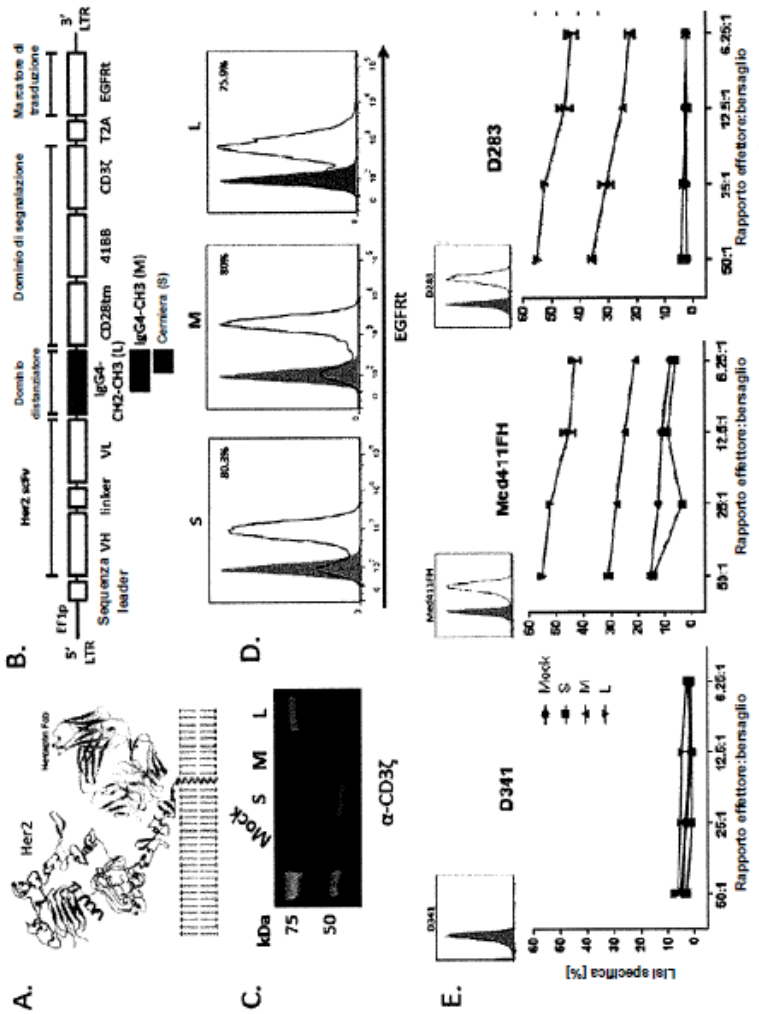

A.
Her2
B.
Her2 scFv
Dominio distanziatore
Dominio di segnalazione
Marcatore di trasduzione
5' LTR
EF1p
Sequenza leader
VH
linker
VL
IgG4-CH2-CH3 (L)
CD28tm
4-1BB
CD3ζ
T2A
EGFRt
3' LTR
IgG4-CH3 (M)
Cerniera (S)
C.
kDa
75
50
Mock
S
M
L
α-CD3ζ
D.
S
M
L
80.3%
93%
75.9%
EGFRt
E.
D341
Mock
S
M
L
Lisi specifica [%]
Rapporto effettore:bersaglio
Mc6411FH
D283

Figura 12

Figura 13

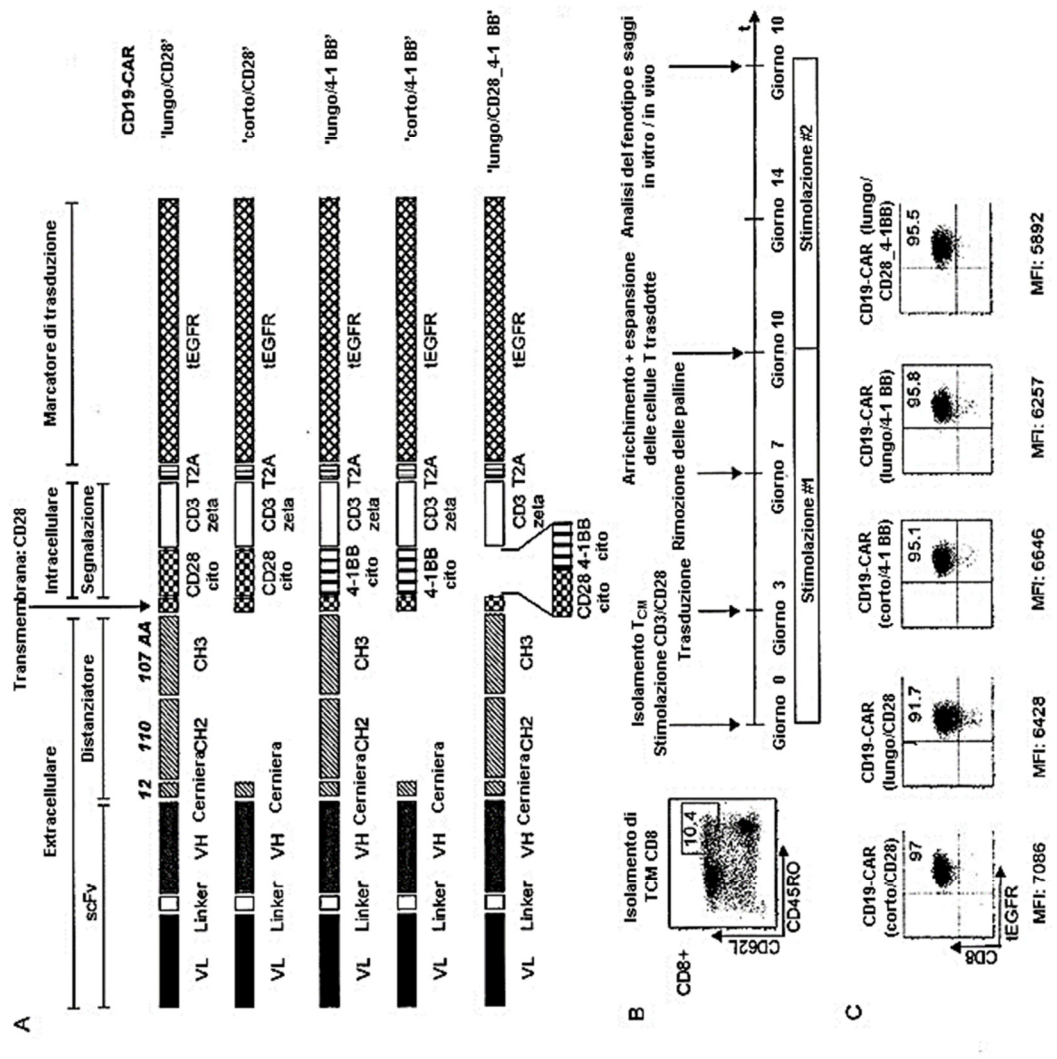

A
Transmembrana: CD28
Extracellulare
Intracellulare
Marcatore di trasduzione
scFv
Distanziatore
Segnalazione
12 110 107 AA
CD19-CAR
VL Linker VH Cerniera CH2 CH3 CD28 cito CD3 zeta T2A tEGFR 'lungo/CD28'
VL Linker VH Cerniera CD28 cito CD3 zeta T2A tEGFR 'corto/CD28'
VL Linker VH Cerniera CH2 CH3 4-1BB cito CD3 zeta T2A tEGFR 'lungo/4-1 BB'
VL Linker VH Cerniera 4-1BB cito CD3 zeta T2A tEGFR 'corto/4-1 BB'
VL Linker VH Cerniera CH2 CH3 CD28 4-1BB cito cito CD3 zeta T2A tEGFR 'lungo/CD28_4-1 BB'
B
Isolamento di TCM CD8
CD8+
CD62L
CD45RO
10,4
Isolamento TCM
Stimolazione CD3/CD28
Trasduzione
Rimozione delle palline
Arricchimento + espansione delle cellule T trasdotte
Analisi del fenotipo e saggi in vitro / in vivo
Giorno 0 Giorno 3 Giorno 7 Giorno 10 Giorno 14 Giorno 10
Stimolazione #1
Stimolazione #2
t
C
CD19-CAR (corto/CD28)
97
CD8
tEGFR
MFI: 7086
CD19-CAR (lungo/CD28
91.7
MFI: 6428
CD19-CAR (corto/4-1 BB)
95.1
MFI: 6646
CD19-CAR (lungo/4-1 BB)
95.8
MFI: 6257
CD19-CAR (lungo/ CD28_4-1BB)
95.5
MFI: 5892

Figura 14

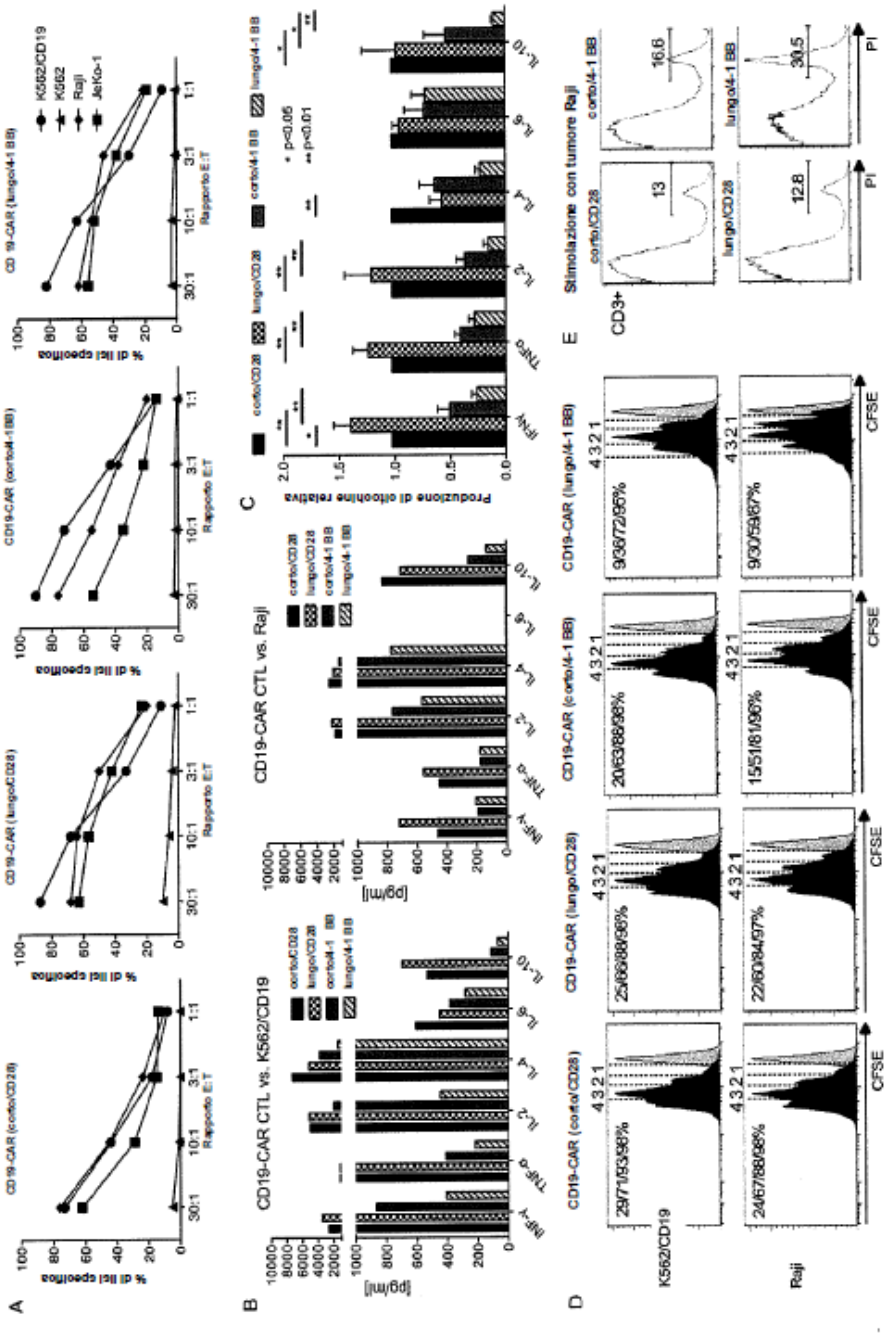

A
B
C
D
E
CD19-CAR CTL vs. K562/CD19
CD19-CAR CTL vs. Raji
Produzione di citochine relativa
Stimolazione con tumore Raji
CD3+
K562/CD19
Raji
CFSE
PI

Figura 15

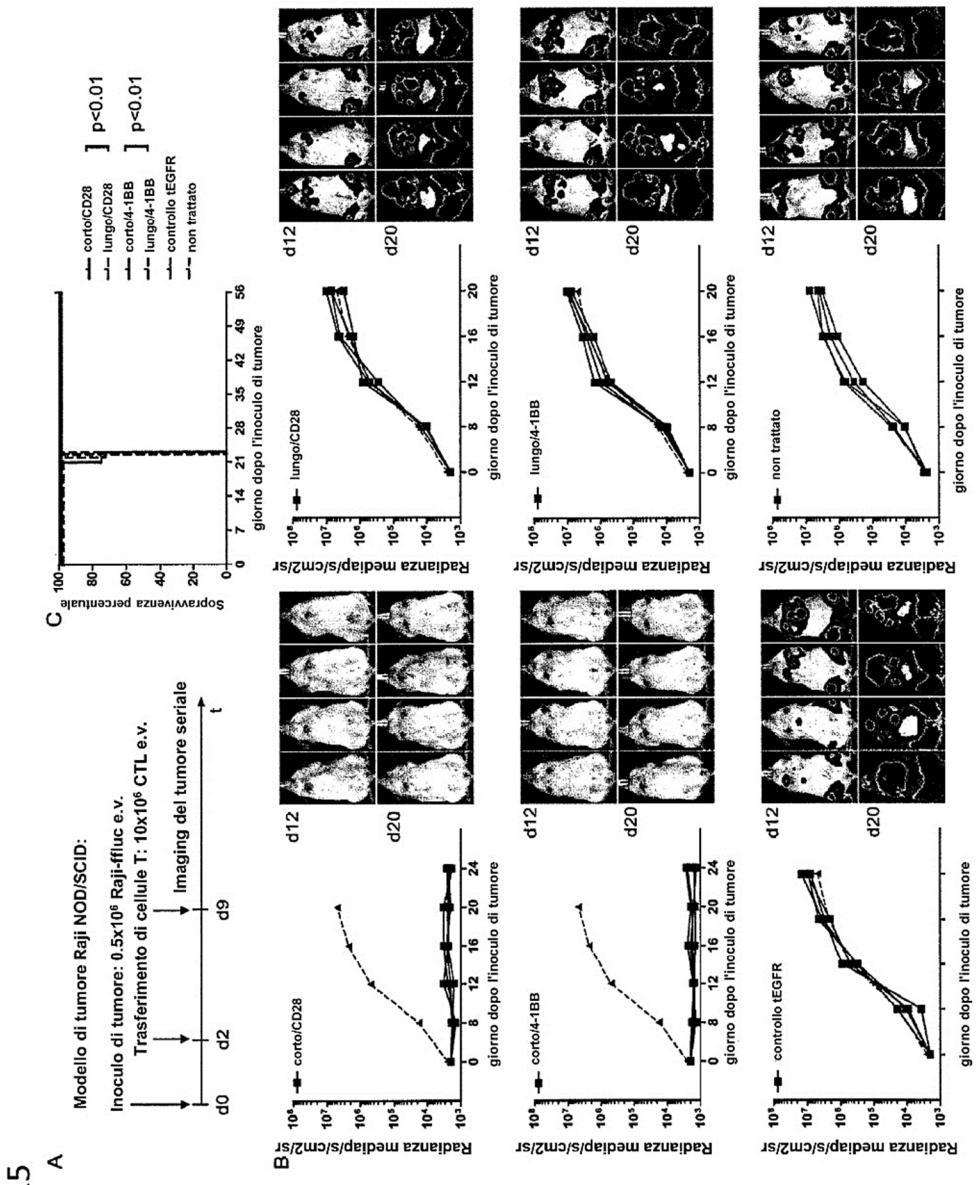

A
Modello di tumore Raji NOD/SCID:
Inoculo di tumore: 0.5x10⁶ Raji-ffluc e.v.
Trasferimento di cellule T: 10x10⁶ CTL e.v.
Imaging del tumore seriale
d0
d2
d9
t
C
Sopravvivenza percentuale
giorno dopo l'inoculo di tumore
corto/CD28
lungo/CD28
corto/4-1BB
lungo/4-1BB
controllo tEGFR
non trattato
p<0.01
p<0.01
B
Radianza media p/s/cm2/sr
giorno dopo l'inoculo di tumore
d12
d20
corto/CD28
lungo/CD28
corto/4-1BB
lungo/4-1BB
controllo tEGFR
non trattato

Figura 16

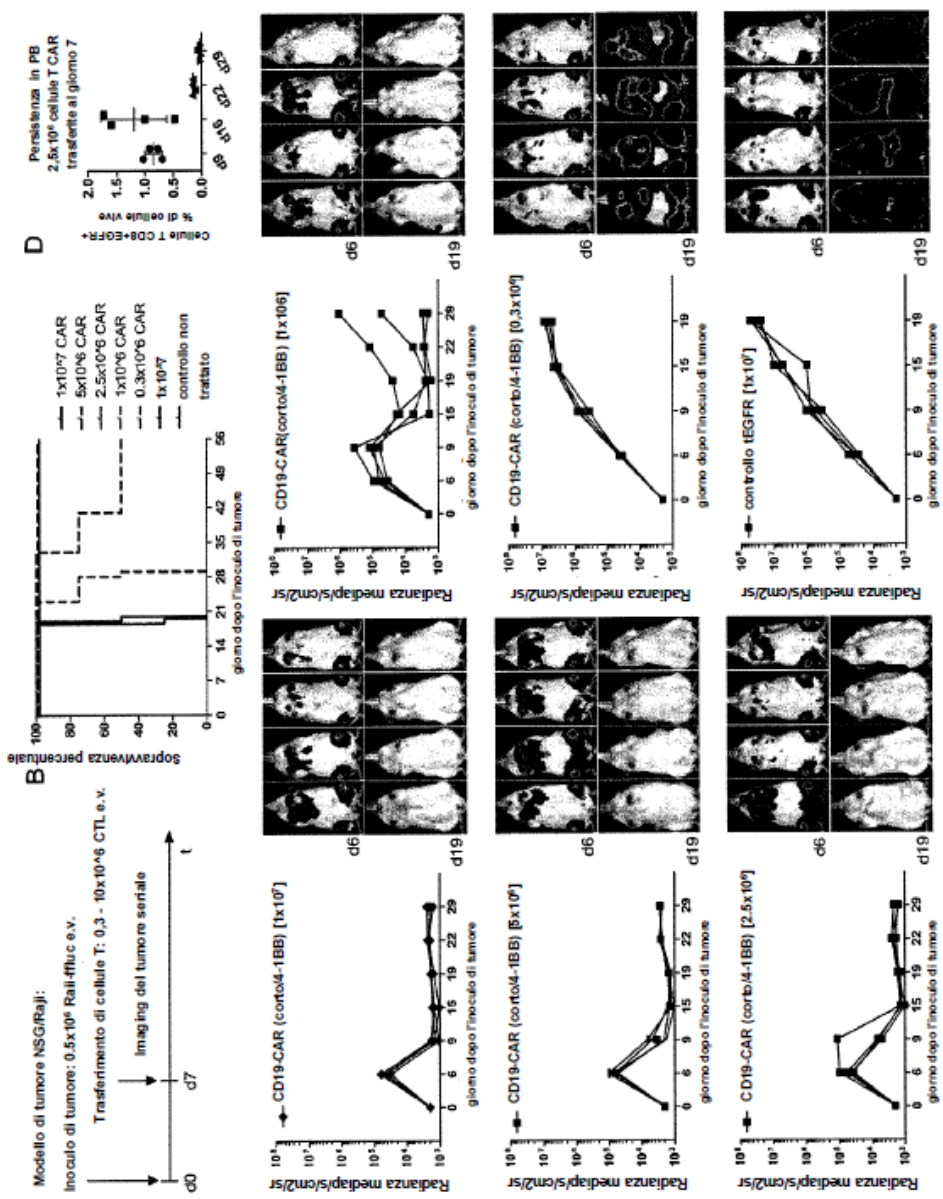

A
Modello di tumore NSG/Raji:
Inoculo di tumore: 0.5x10⁶ Raji-ffluc e.v.
Trasferimento di cellule T: 0,3 - 10x10⁶ CTL e.v.
Imaging del tumore seriale
d0
d7
t
B
Sopravvivenza percentuale
giorno dopo l'inoculo di tumore
1x10^7 CAR
5x10^6 CAR
2.5x10^6 CAR
1x10^6 CAR
0.3x10^6 CAR
1x10^7
controllo non trattato
C
CD19-CAR (corto/4-1BB) [1x10^7]
CD19-CAR (corto/4-1BB) [5x10^6]
CD19-CAR (corto/4-1BB) [2.5x10^6]
CD19-CAR(corto/4-1BB) [1x10^6]
CD19-CAR (corto/4-1BB) [0,3x10^6]
controllo tEGFR [1x10^7]
Radianza media p/s/cm2/sr
giorno dopo l'inoculo di tumore
d6
d19
D
Persistenza in PB
2.5x10^6 cellule T CAR
trasferite al giorno 7
Cellule T CD8+EGFR+
% di cellule vive

Figura 17

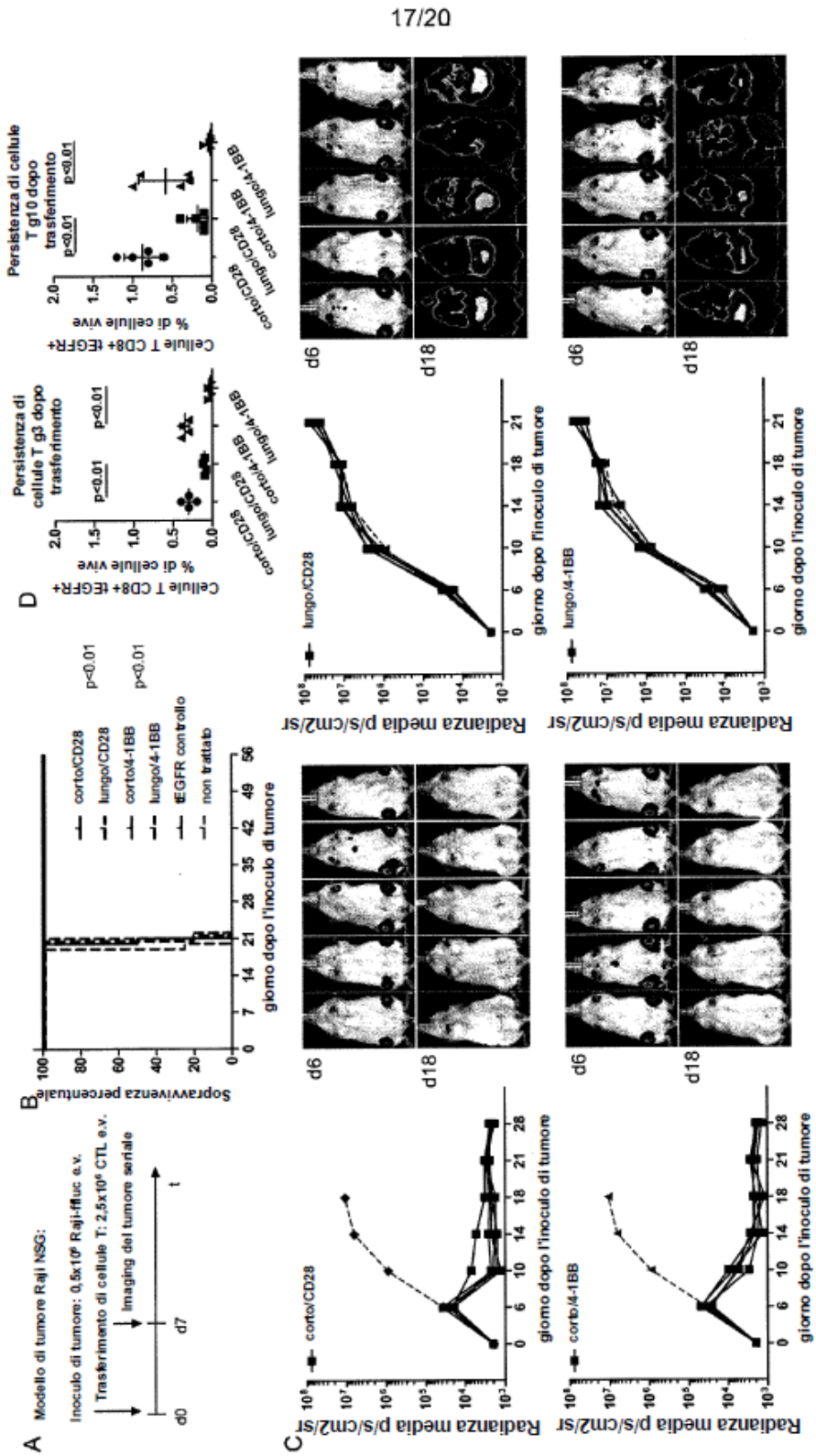

17/20
A
Modello di tumore Raji NSG:
Inoculo di tumore: 0,5x10⁶ Raji-ffluc e.v.
Trasferimento di cellule T: 2,5x10⁶ CTL e.v.
Imaging del tumore seriale
d0
d7
t
B
Sopravvivenza percentuale
giorno dopo l'inoculo di tumore
corto/CD28
lungo/CD28
corto/4-1BB
lungo/4-1BB
tEGFR controllo
non trattato
p<0.01
p<0.01
C
corto/CD28
corto/4-1BB
Radianza media p/s/cm2/sr
giorno dopo l'inoculo di tumore
d6
d18
D
Persistenza di cellule T g3 dopo trasferimento
Persistenza di cellule T g10 dopo trasferimento
Cellule T CD8+ tEGFR+ % di cellule vive
p<0.01
p<0.01
corto/CD28
lungo/CD28
corto/4-1BB
lungo/4-1BB

Figura 18

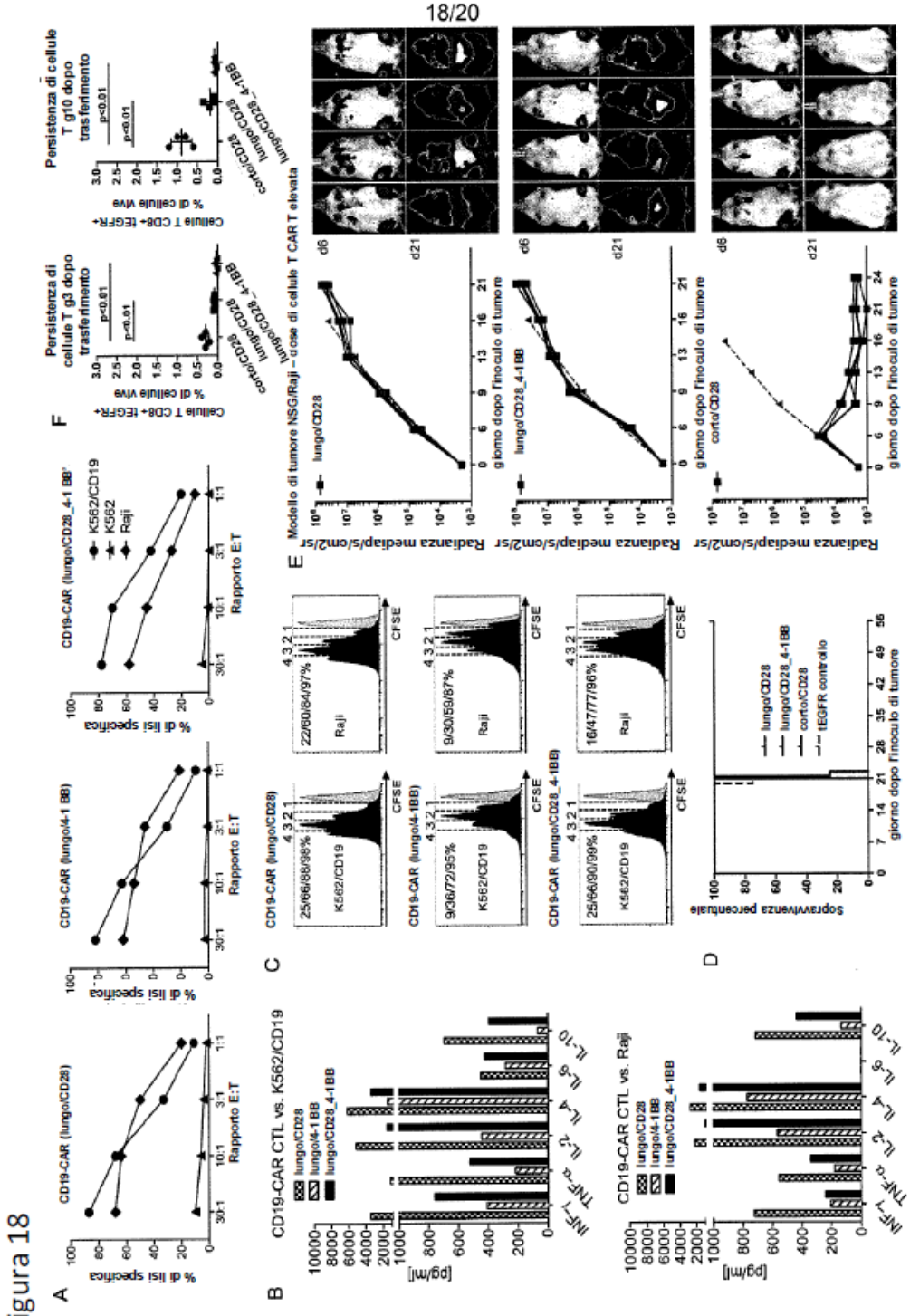

18/20
A
CD19-CAR (lungo/CD28)
% di lisi specifica
Rapporto E:T
B
CD19-CAR CTL vs. K562/CD19
lungo/CD28
lungo/4-1BB
lungo/CD28_4-1BB
[pg/ml]
IFN-γ
TNF-α
IL-2
IL-4
IL-5
IL-10
CD19-CAR CTL vs. Raji
C
CD19-CAR (lungo/4-1 BB)
CD19-CAR (lungo/CD28_4-1 BB)
K562/CD19
K562
Raji
CD19-CAR (lungo/CD28)
CD19-CAR (lungo/4-1BB)
CD19-CAR (lungo/CD28_4-1BB)
CFSE
25/66/88/98%
9/36/72/95%
22/60/84/97%
9/30/59/87%
16/47/77/96%
25/66/90/99%
D
sopravvivenza percentuale
giorno dopo l'inoculo di tumore
lungo/CD28
lungo/CD28_4-1BB
corto/CD28
tEGFR controllo
E
Modello di tumore NSG/Raji – dose di cellule T CAR T elevata
lungo/CD28
lungo/CD28_4-1BB
corto/CD28
Radianza mediap/s/cm2/sr
giorno dopo l'inoculo di tumore
d6
d21
F
Persistenza di cellule T g3 dopo trasferimento
Persistenza di cellule T g10 dopo trasferimento
Cellule T CD8+ tEGFR+
% di cellule VIVE
p<0.01
p=0.01
contro
lungo/CD28
lungo/CD28_4-1BB

Figura 19

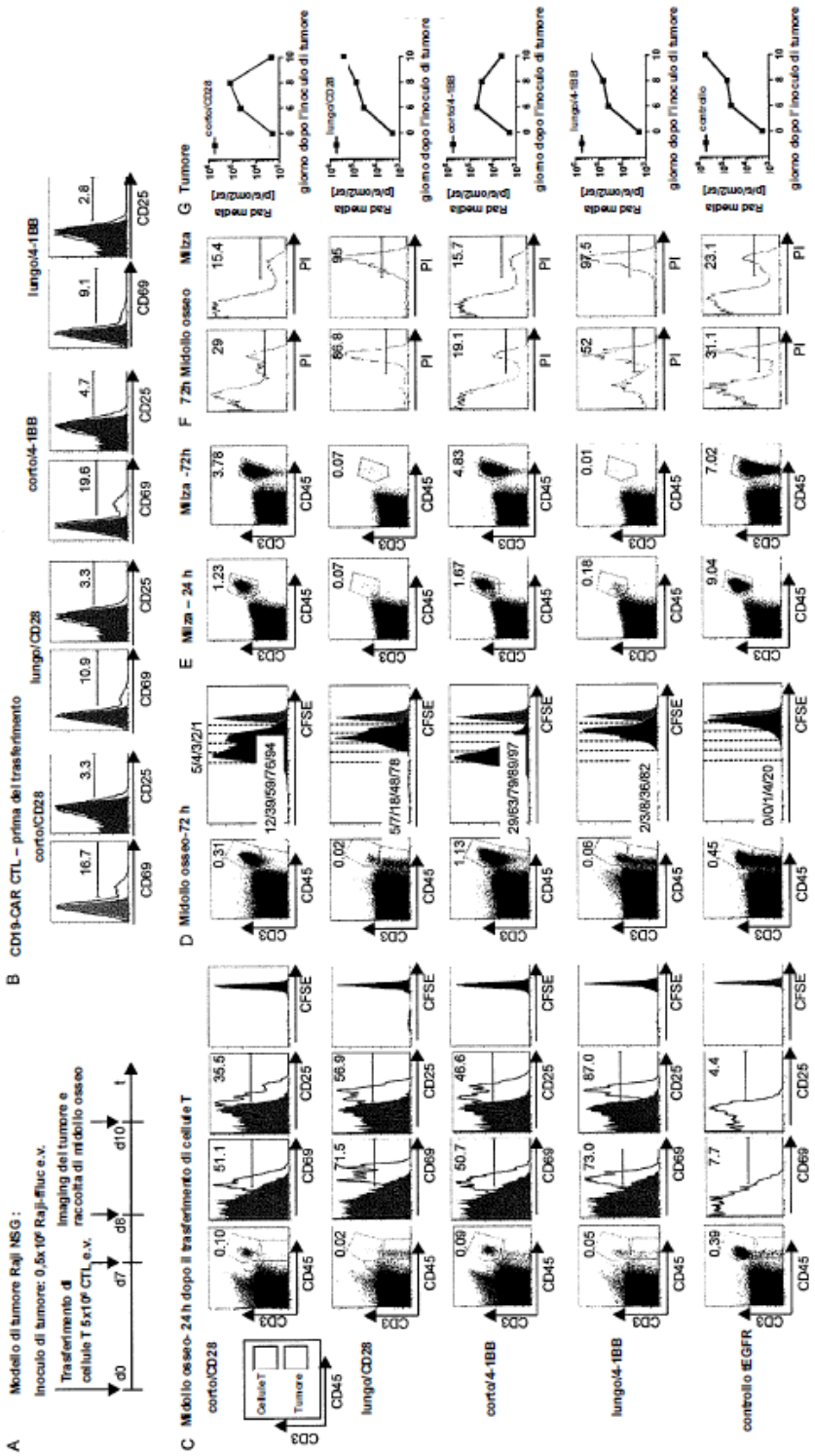
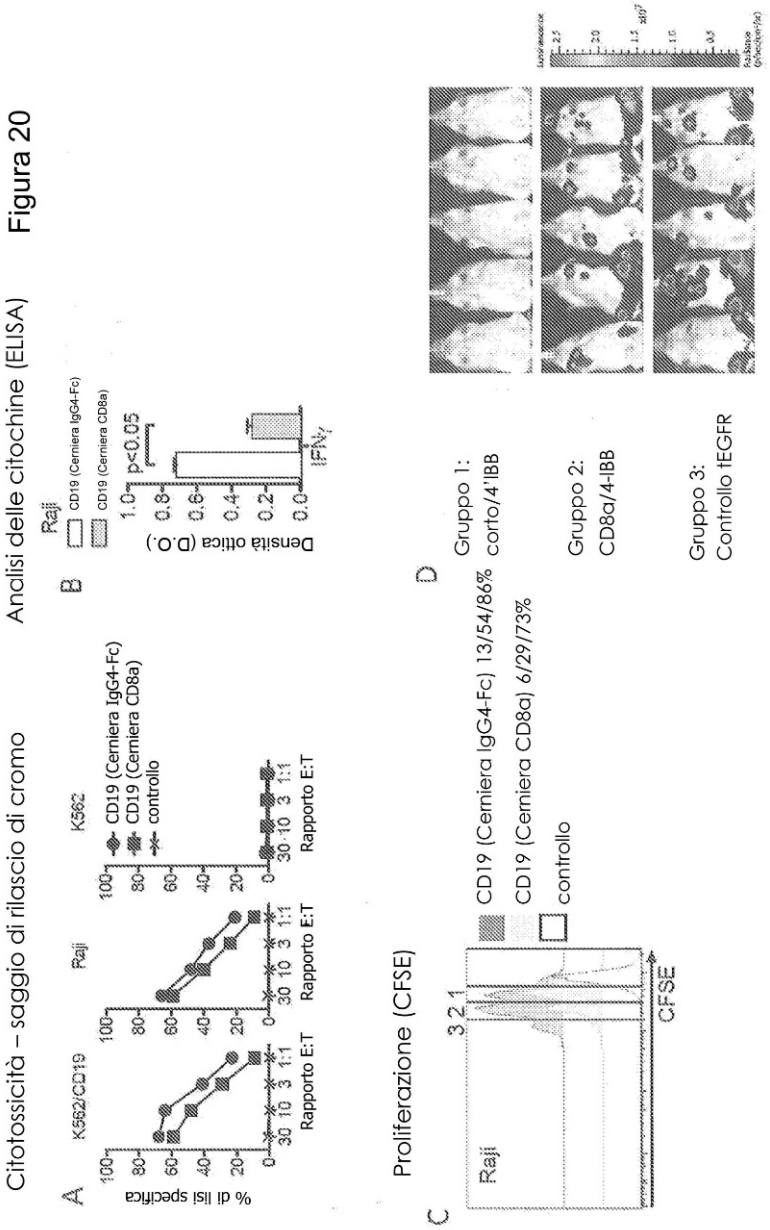

A
Modello di tumore Raji NSG :
Inoculo di tumore: 0,8x10⁶ Raji-fluc e.v.
Trasferimento di cellule T 5x10⁶ CTL e.v.
Imaging del tumore e raccolta di midollo osseo
d0
d7
d8
d10
B
CD19-CAR CTL – prima del trasferimento
corto/CD28
lungo/CD28
corto/4-1BB
lungo/4-1BB
CD69
CD25
C
Midollo osseo- 24 h dopo il trasferimento di cellule T
corto/CD28
lungo/CD28
corto/4-1BB
lungo/4-1BB
controllo sEGFR
CD3
CD45
CFSE
D
Midollo osseo-72 h
5/4/3/2/1
12/39/58/76/94
5/7/18/48/78
29/63/79/89/97
2/3/8/36/82
0/0/14/20
E
Milza – 24 h
Milza -72h
F
72h Midollo osseo
Milza
PI
G
Tumore
Rad media [p/s/cm2/sr]
giorno dopo l'inoculo di tumore

Figura 20


Citotossicità – saggio di rilascio di cromo
Analisi delle citochine (ELISA)
A
K562/CD19
Raji
K562
% di lisi specifica
CD19 (Cerniera IgG4-Fc)
CD19 (Cerniera CD8a)
controllo
Rapporto E:T
B
Raji
CD19 (Cerniera IgG4-Fc)
CD19 (Cerniera CD8a)
p<0.05
Densità ottica (D.O.)
IFNγ
C
Proliferazione (CFSE)
Raji
CD19 (Cerniera IgG4-Fc) 13/54/86%
CD19 (Cerniera CD8a) 6/29/73%
controllo
CFSE
D
Gruppo 1:
corto/4'IBB
Gruppo 2:
CD8a/4-IBB
Gruppo 3:
Controllo tEGFR

ELENCO DELLE SEQUENZE

<110> Jensen, Michael
Riddell, Stanley R.
Hudecek, Michael

<120> METODI E COMPOSIZIONI PER IMMUNOTERAPIA CELLULARE

<130> 15950.0012WOU1

<140> Nuovo deposito
<141> 2013-08-20

<150> US 61/691,117
<151> 2012-08-20

<160> 56

<170> PatentIn versione 3.5

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sintetica

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa è glicina, cisteina o arginina

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa è cisteina o treonina

<400> 1

Xaa Pro Pro Xaa Pro
1 5

<210> 2
<211> 66
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sintetica

<400> 2
atgctgctgc tggtgaccag cctgctgctg tgcgagctgc cccaccccgc ctttctgctg 60

atcccc 66

<210> 3
<211> 735
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sintetica

<400> 3
gacatccaga tgacccagac cacctccagc ctgagcgcca gcctgggcga ccgggtgacc 60

atcagctgcc gggccagcca ggacatcagc aagtacctga actggtatca gcagaagccc 120

gacggcaccg tcaagctgct gatctaccac accagccggc tgcacagcgg cgtgcccagc 180

cggtttagcg gcagcggctc cggcaccgac tacagcctga ccatctccaa cctggaacag 240

gaagatatcg ccacctactt ttgccagcag ggcaacacac tgccctacac ctttggcggc 300

ggaacaaagc tggaaatcac cggcagcacc tccggcagcg gcaagcctgg cagcggcgag 360

ggcagcacca agggcgaggt gaagctgcag gaaagcggcc ctggcctggt ggcccccagc 420

cagagcctga gcgtgacctg caccgtgagc ggcgtgagcc tgcccgacta cggcgtgagc 480

tggatccggc agcccccccag gaagggcctg gaatggctgg gcgtgatctg gggcagcgag 540

accacctact acaacagcgc cctgaagagc cggctgacca tcatcaagga caacagcaag 600

agccaggtgt tcctgaagat gaacagcctg cagaccgacg acaccgccat ctactactgc 660

gccaagcact actactacgg cggcagctac gccatggact actggggcca gggcaccagc 720

gtgaccgtga gcagc 735

<210> 4
<211> 36
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sintetica

<400> 4
gaatctaagt acggaccgcc ctgcccccct tgccct 36

<210> 5
<211> 84
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sintetica

<400> 5
atgttctggg tgctggtggt ggtcggaggc gtgctggcct gctacagcct gctggtcacc 60

gtggccttca tcatcttttg ggtg 84

<210> 6
<211> 126
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sintetica

<400> 6
aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacaac catttatgag accagtacaa 60

actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt 120

gaactg 126

<210> 7
<211> 336
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sintetica

<400> 7
cgggtgaagt tcagcagaag cgccgacgcc cctgcctacc agcagggcca gaatcagctg 60

tacaacgagc tgaacctggg cagaagggaa gagtacgacg tcctggataa gcggagaggc 120

cgggaccctg agatgggcgg caagcctcgg cggaagaacc cccaggaagg cctgtataac 180

gaactgcaga aagacaagat ggccgaggcc tacagcgaga tcggcatgaa gggcgagcgg 240

aggcggggca agggccacga cggcctgtat cagggcctgt ccaccgccac caaggatacc 300

tacgacgccc tgcacatgca ggccctgccc ccaagg 336

<210> 8
<211> 72
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sintetica

<400> 8
ctcgagggcg gcggagaggg cagaggaagt cttctaacat gcggtgacgt ggaggagaat 60

cccggcccta gg 72

<210> 9
<211> 1074
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sintetica

<400> 9
atgcttctcc tggtgacaag ccttctgctc tgtgagttac cacacccagc attcctcctg 60

atcccacgca aagtgtgtaa cggaataggt attggtgaat ttaaagactc actctccata 120

aatgctacga atattaaaca cttcaaaaac tgcacctcca tcagtggcga tctccacatc 180

ctgccggtgg catttagggg tgactccttc acacatactc ctcctctgga tccacaggaa 240

ctggatattc tgaaaaccgt aaaggaaatc acagggtttt tgctgattca ggcttggcct 300

gaaaacagga cggacctcca tgcctttgag aacctagaaa tcatacgcgg caggaccaag 360

caacatggtc agttttctct tgcagtcgtc agcctgaaca taacatcctt gggattacgc 420

tccctcaagg agataagtga tggagatgtg ataatttcag gaaacaaaaa tttgtgctat 480

gcaaatacaa taaactggaa aaaactgttt gggacctccg gtcagaaaac caaaattata 540

agcaacagag gtgaaaacag ctgcaaggcc acaggccagg tctgccatgc cttgtgctcc 600

cccgagggct gctggggccc ggagcccagg gactgcgtct cttgccggaa tgtcagccga 660

ggcagggaat gcgtggacaa gtgcaacctt ctggagggtg agccaaggga gtttgtggag 720

aactctgagt gcatacagtg ccacccagag tgcctgcctc aggccatgaa catcacctgc 780

acaggacggg gaccagacaa ctgtatccag tgtgcccact acattgacgg cccccactgc 840

gtcaagacct gcccggcagg agtcatggga gaaaacaaca ccctggtctg gaagtacgca 900

gacgccggcc atgtgtgcca cctgtgccat ccaaactgca cctacggatg cactgggcca 960

ggtcttgaag gctgtccaac gaatgggcct aagatcccgt ccatcgccac tgggatggtg 1020

ggggccctcc tcttgctgct ggtggtggcc ctggggatcg gcctcttcat gtga 1074

<210> 10
<211> 2529
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sintetica

<400> 10
atgctgctgc tggtgaccag cctgctgctg tgcgagctgc cccaccccgc ctttctgctg 60

atccccgaca tccagatgac ccagaccacc tccagcctga gcgccagcct gggcgaccgg 120

gtgaccatca gctgccgggc cagccaggac atcagcaagt acctgaactg gtatcagcag 180

aagcccgacg gcaccgtcaa gctgctgatc taccacacca gccggctgca cagcggcgtg 240

cccagccggt ttagcggcag cggctccggc accgactaca gcctgaccat ctccaacctg 300

gaacaggaag atatcgccac ctacttttgc cagcagggca acacactgcc ctacaccttt 360

ggcggcggaa caaagctgga aatcaccggc agcacctccg gcagcggcaa gcctggcagc 420

ggcgagggca gcaccaaggg cgaggtgaag ctgcaggaaa gcggccctgg cctggtggcc 480

cccagccaga gcctgagcgt gacctgcacc gtgagcggcg tgagcctgcc cgactacggc 540

gtgagctgga tccggcagcc ccccaggaag ggcctggaat ggctgggcgt gatctggggc 600

agcgagacca cctactacaa cagcgccctg aagagccggc tgaccatcat caaggacaac 660

agcaagagcc aggtgttcct gaagatgaac agcctgcaga ccgacgacac cgccatctac 720

tactgcgcca agcactacta ctacggcggc agctacgcca tggactactg gggccagggc 780

accagcgtga ccgtgagcag cgagagcaag tacggaccgc cctgcccccc ttgccctatg 840

ttctgggtgc tggtggtggt cggaggcgtg ctggcctgct acagcctgct ggtcaccgtg 900

gccttcatca tcttttgggt gaaacggggc agaaagaaac tcctgtatat attcaaacaa 960

ccatttatga gaccagtaca aactactcaa gaggaagatg gctgtagctg ccgatttcca 1020

gaagaagaag aaggaggatg tgaactgcgg gtgaagttca gcagaagcgc cgacgcccct 1080

gcctaccagc agggccagaa tcagctgtac aacgagctga acctgggcag aagggaagag 1140

tacgacgtcc tggataagcg gagaggccgg gaccctgaga tgggcggcaa gcctcggcgg 1200

aagaaccccc aggaaggcct gtataacgaa ctgcagaaag acaagatggc cgaggcctac 1260

agcgagatcg gcatgaaggg cgagcggagg cggggcaagg gccacgacgg cctgtatcag 1320

ggcctgtcca ccgccaccaa ggatacctac gacgccctgc acatgcaggc cctgccccca 1380

aggctcgagg gcggcggaga gggcagagga agtcttctaa catgcggtga cgtggaggag 1440

aatcccggcc ctaggatgct tctcctggtg acaagccttc tgctctgtga gttaccacac 1500

ccagcattcc tcctgatccc acgcaaagtg tgtaacggaa taggtattgg tgaatttaaa 1560

gactcactct ccataaatgc tacgaatatt aaacacttca aaaactgcac ctccatcagt 1620

ggcgatctcc acatcctgcc ggtggcattt aggggtgact ccttcacaca tactcctcct 1680

ctggatccac aggaactgga tattctgaaa accgtaaagg aaatcacagg gtttttgctg 1740

attcaggctt ggcctgaaaa caggacggac ctccatgcct ttgagaacct agaaatcata 1800

cgcggcagga ccaagcaaca tggtcagttt tctcttgcag tcgtcagcct gaacataaca 1860

tccttgggat tacgctccct caaggagata agtgatggag atgtgataat ttcaggaaac 1920

aaaaatttgt gctatgcaaa tacaataaac tggaaaaaac tgtttgggac ctccggtcag 1980

aaaaccaaaa ttataagcaa cagaggtgaa aacagctgca aggccacagg ccaggtctgc 2040

catgccttgt gctcccccga gggctgctgg ggcccggagc ccagggactg cgtctcttgc 2100

cggaatgtca gccgaggcag ggaatgcgtg gacaagtgca accttctgga gggtgagcca 2160

agggagtttg tggagaactc tgagtgcata cagtgccacc cagagtgcct gcctcaggcc 2220

atgaacatca cctgcacagg acggggacca gacaactgta tccagtgtgc ccactacatt 2280

gacggccccc actgcgtcaa gacctgcccg gcaggagtca tgggagaaaa caacaccctg 2340

gtctggaagt acgcagacgc cggccatgtg tgccacctgt gccatccaaa ctgcacctac 2400

ggatgcactg ggccaggtct tgaaggctgt ccaacgaatg ggcctaagat cccgtccatc 2460

gccactggga tggtgggggc cctcctcttg ctgctggtgg tggccctggg gatcggcctc 2520

ttcatgtga 2529

<210> 11
<211> 841
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sintetica

<400> 11

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

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly
50 55 60

Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln
100 105 110

Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
115 120 125

Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
130 135 140

Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
145 150 155 160

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu
165 170 175

Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu
180 185 190

Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser
195 200 205

Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln

```
    210                 215                 220

Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr
225                 230                 235                 240

Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
                245                 250                 255

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Glu Ser Lys Tyr Gly
            260                 265                 270

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Met Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly
        275                 280                 285

Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile
    290                 295                 300

Phe Trp Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln
305                 310                 315                 320

Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser
                325                 330                 335

Cys Arg Phe Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe
            340                 345                 350

Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu
        355                 360                 365

Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp
    370                 375                 380

Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys
385                 390                 395                 400

Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala
                405                 410                 415

Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys
            420                 425                 430

Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr
        435                 440                 445

Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Leu Glu Gly Gly
    450                 455                 460
```

```
Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn
465                 470                 475                 480

Pro Gly Pro Arg Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu
                485                 490                 495

Leu Pro His Pro Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly
            500                 505                 510

Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn
        515                 520                 525

Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile
    530                 535                 540

Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu
545                 550                 555                 560

Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly
                565                 570                 575

Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala
            580                 585                 590

Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln
        595                 600                 605

Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg
    610                 615                 620

Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys
625                 630                 635                 640

Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr
                645                 650                 655

Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys
            660                 665                 670

Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys
        675                 680                 685

Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg
    690                 695                 700

Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg
705                 710                 715                 720
```

Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu
725 730 735

Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys
740 745 750

Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys
755 760 765

Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala
770 775 780

Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly
785 790 795 800

Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile
805 810 815

Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val
820 825 830

Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met
835 840

<210> 12
<211> 15
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sintetica

<400> 12

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 13
<211> 327
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

```
        35                  40                  45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
            100                 105                 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
        115                 120                 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
    130                 135                 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145                 150                 155                 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
                165                 170                 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
            180                 185                 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
        195                 200                 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
    210                 215                 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225                 230                 235                 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
                245                 250                 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
            260                 265                 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
        275                 280                 285
```

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 14
<211> 220
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

Met Leu Arg Leu Leu Leu Ala Leu Asn Leu Phe Pro Ser Ile Gln Val
1 5 10 15

Thr Gly Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Met Leu Val Ala Tyr
20 25 30

Asp Asn Ala Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Ser Tyr Asn Leu Phe Ser
35 40 45

Arg Glu Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly Leu Asp Ser Ala Val Glu
50 55 60

Val Cys Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser
65 70 75 80

Lys Thr Gly Phe Asn Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Ser Val Thr
85 90 95

Phe Tyr Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe Cys
100 105 110

Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser
115 120 125

Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro
130 135 140

Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly
145 150 155 160

Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile
165 170 175

Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met
180 185 190

Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro
195 200 205

Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
210 215 220

<210> 15
<211> 255
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

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

Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro
20 25 30

Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys
35 40 45

Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile
50 55 60

Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser
65 70 75 80

Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly
85 90 95

Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu
100 105 110

Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln
115 120 125

Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys
130 135 140

Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro
145 150 155 160

Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala
165 170 175

Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu
180 185 190

Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu
195 200 205

Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
210 215 220

Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly
225 230 235 240

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
245 250 255

<210> 16
<211> 164
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu
1 5 10 15

Pro Ile Thr Glu Ala Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys
20 25 30

Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala
35 40 45

Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
50 55 60

Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
65 70 75 80

Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
85 90 95

Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn
100 105 110

Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
115 120 125

Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
130 135 140

Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala
145 150 155 160

Leu Pro Pro Arg

<210> 17
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

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

<210> 18
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 19
<211> 61
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr His Thr Cys Pro Arg Cys Pro
1 5 10 15

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu
20 25 30

Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro
35 40 45

Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
50 55 60

<210> 20
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro
1 5 10

<210> 21
<211> 12
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sintetica

<400> 21

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 22
<211> 26
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Primer

<400> 22
atcaaaagaa tagaccgaga tagggt 26

<210> 23
<211> 26
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Primer

<400> 23
ccgtaccttt aagaccaatg acttac 26

<210> 24
<211> 18
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Primer

<400> 24
ttgagagttt tcgccccg 18

<210> 25
<211> 24
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Primer

<400> 25
aatagacaga tcgctgagat aggt 24

<210> 26
<211> 18
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Primer

<400> 26
caggtatccg gtaagcgg 18

<210> 27
<211> 19
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Primer

<400> 27
cgaccagcaa ccatagtcc 19

<210> 28
<211> 18
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Primer

<400> 28
tagcggtttg actcacgg 18

<210> 29
<211> 20
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Primer

<400> 29
gcagggagct agaacgattc 20

<210> 30
<211> 22
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Primer

<400> 30
attgtctggt atagtgcagc ag 22

<210> 31
<211> 16
<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Primer

<400> 31
tcgcaacggg tttgcc 16

<210> 32
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Primer

<400> 32
aggaagatat cgccacctac t 21

<210> 33
<211> 20
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Primer

<400> 33
cgggtgaagt tcagcagaag 20

<210> 34
<211> 20
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Primer

<400> 34
actgtgtttg ctgacgcaac 20

<210> 35
<211> 20
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Primer

<400> 35
atgcttctcc tggtgacaag 20

<210> 36
<211> 18
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Sintetica

<400> 36

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 37
<211> 10051
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sintetica

<400> 37
gttagaccag atctgagcct gggagctctc tggctaacta gggaacccac tgcttaagcc 60

tcaataaagc ttgccttgag tgcttcaagt agtgtgtgcc cgtctgttgt gtgactctgg 120

taactagaga tccctcagac cttttagtc agtgtggaaa atctctagca gtggcgcccg 180

aacagggact tgaaagcgaa agggaaacca gaggagctct ctcgacgcag gactcggctt 240

gctgaagcgc gcacggcaag aggcgagggg cggcgactgg tgagtacgcc aaaaattttg 300

actagcggag gctagaagga gagagatggg tgcgagagcg tcagtattaa gcgggggaga 360

attagatcga tgggaaaaaa ttcggttaag gccaggggga aagaaaaaat ataaattaaa 420

acatatagta tgggcaagca gggagctaga acgattcgca gttaatcctg gcctgttaga 480

aacatcagaa ggctgtagac aaatactggg acagctacaa ccatcccttc agacaggatc 540

agaagaactt agatcattat ataatacagt agcaaccctc tattgtgtgc atcaaaggat 600

agagataaaa gacaccaagg aagctttaga caagatagag gaagagcaaa acaaaagtaa 660

gaaaaaagca cagcaagcag cagctgacac aggacacagc aatcaggtca gccaaaatta 720

ccctatagtg cagaacatcc aggggcaaat ggtacatcag gccatatcac ctagaacttt 780

aaatgcatgg gtaaaagtag tagaagagaa ggctttcagc ccagaagtga tacccatgtt 840

ttcagcatta tcagaaggag ccaccccaca agatttaaac accatgctaa acacagtggg 900

gggacatcaa gcagccatgc aaatgttaaa agagaccatc aatgaggaag ctgcaggcaa 960

agagaagagt ggtgcagaga gaaaaaagag cagtgggaat aggagctttg ttccttgggt 1020

tcttgggagc agcaggaagc actatgggcg cagcgtcaat gacgctgacg gtacaggcca 1080

gacaattatt gtctggtata gtgcagcagc agaacaattt gctgagggct attgaggcgc 1140

aacagcatct gttgcaactc acagtctggg gcatcaagca gctccaggca agaatcctgg 1200

ctgtggaaag atacctaaag gatcaacagc tcctggggat ttggggttgc tctggaaaac 1260

tcatttgcac cactgctgtg ccttggatct acaaatggca gtattcatcc acaattttaa 1320

aagaaaaggg gggattgggg ggtacagtgc aggggaaaga atagtagaca taatagcaac 1380

agacatacaa actaaagaat tacaaaaaca aattacaaaa attcaaaatt ttcgggttta 1440

ttacagggac agcagagatc cagtttgggg atcaattgca tgaagaatct gcttagggtt 1500

aggcgttttg cgctgcttcg cgaggatctg cgatcgctcc ggtgcccgtc agtgggcaga 1560

gcgcacatcg cccacagtcc ccgagaagtt ggggggaggg gtcggcaatt gaaccggtgc 1620

ctagagaagg tggcgcgggg taaactggga aagtgatgtc gtgtactggc tccgcctttt 1680

tcccgagggt gggggagaac cgtatataag tgcagtagtc gccgtgaacg ttctttttcg 1740

caacgggttt gccgccagaa cacagctgaa gcttcgaggg gctcgcatct ctccttcacg 1800

cgcccgccgc cctacctgag gccgccatcc acgccggttg agtcgcgttc tgccgcctcc 1860

cgcctgtggt gcctcctgaa ctgcgtccgc cgtctaggta agtttaaagc tcaggtcgag 1920

accgggcctt tgtccggcgc tcccttggag cctacctaga ctcagccggc tctccacgct 1980

ttgcctgacc ctgcttgctc aactctacgt ctttgtttcg ttttctgttc tgcgccgtta 2040

cagatccaag ctgtgaccgg cgcctacggc tagcgaattc ctcgaggcca ccatgctgct 2100

gctggtgaca agcctgctgc tgtgcgagct gccccacccc gcctttctgc tgatccccca 2160

ggaacagctc gtcgaaagcg gcggcagact ggtgacacct ggcggcagcc tgaccctgag 2220

ctgcaaggcc agcggcttcg acttcagcgc ctactacatg agctgggtcc gccaggcccc 2280

tggcaaggga ctggaatgga tcgccaccat ctaccccagc agcggcaaga cctactacgc 2340

cacctgggtg aacggacggt tcaccatctc cagcgacaac gcccagaaca ccgtggacct 2400

gcagatgaac agcctgacag ccgccgaccg ggccacctac ttttgcgcca gagacagcta 2460

cgccgacgac ggcgccctgt tcaacatctg gggccctggc accctggtga caatctctag 2520

cggcggaggc ggatctggtg gcggaggaag tggcggcgga ggatctgagc tggtgctgac 2580

ccagagcccc tctgtgtctg ctgccctggg aagccctgcc aagatcacct gtaccctgag 2640

cagcgcccac aagaccgaca ccatcgactg gtatcagcag ctgcagggcg aggcccccag 2700

atacctgatg caggtgcaga gcgacggcag ctacaccaag aggccaggcg tgcccgaccg 2760

gttcagcgga tctagctctg gcgccgaccg ctacctgatc atccccagcg tgcaggccga 2820

tgacgaggcc gattactact gtggcgccga ctacatcggc ggctacgtgt tcggcggagg 2880

cacccagctg accgtgaccg gcgagtctaa gtacggaccg ccctgccccc cttgccctgc 2940

ccccgagttc ctgggcggac ccagcgtgtt cctgttcccc cccaagccca aggacaccct 3000

gatgatcagc cggacccccg aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgagcc aggaagatcc 3060

cgaggtccag ttcaattggt acgtggacgg cgtggaagtg cacaacgcca agaccaagcc 3120

cagagaggaa cagttcaaca gcacctaccg ggtggtgtct gtgctgaccg tgctgcacca 3180

ggactggctg aacggcaaag aatacaagtg caaggtgtcc aacaagggcc tgcccagcag 3240

catcgaaaag accatcagca aggccaaggg ccagcctcgc gagccccagg tgtacaccct 3300

gcctccctcc caggaagaga tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgcc tggtgaaggg 3360

cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggccagcctg agaacaacta 3420

caagaccacc cctcccgtgc tggacagcga cggcagcttc ttcctgtaca gccggctgac 3480

cgtggacaag agccggtggc aggaaggcaa cgtctttagc tgcagcgtga tgcacgaggc 3540

cctgcacaac cactacaccc agaagagcct gagcctgtcc ctgggcaaga tgttctgggt 3600

gctggtggtg gtgggcgggg tgctggcctg ctacagcctg ctggtgacag tggccttcat 3660

catcttttgg gtgaaacggg gcagaaagaa actcctgtat atattcaaac aaccatttat 3720

gagaccagta caaactactc aagaggaaga tggctgtagc tgccgatttc cagaagaaga 3780

agaaggagga tgtgaactgc gggtgaagtt cagcagaagc gccgacgccc ctgcctacca 3840

gcagggccag aatcagctgt acaacgagct gaacctgggc agaagggaag agtacgacgt 3900

cctggataag cggagaggcc gggaccctga gatgggcggc aagcctcggc ggaagaaccc 3960

ccaggaaggc ctgtataacg aactgcagaa agacaagatg gccgaggcct acagcgagat 4020

cggcatgaag ggcgagcgga ggcggggcaa gggccacgac ggcctgtatc agggcctgtc 4080

caccgccacc aaggatacct acgacgccct gcacatgcag gccctgcccc caaggctcga 4140

gggcggcgga gagggcagag gaagtcttct aacatgcggt gacgtggagg agaatcccgg 4200

ccctaggatg cttctcctgg tgacaagcct tctgctctgt gagttaccac acccagcatt 4260

cctcctgatc ccacgcaaag tgtgtaacgg aataggtatt ggtgaattta aagactcact 4320

ctccataaat gctacgaata ttaaacactt caaaaactgc acctccatca gtggcgatct 4380

ccacatcctg ccggtggcat ttaggggtga ctccttcaca catactcctc ctctggatcc 4440

acaggaactg gatattctga aaaccgtaaa ggaaatcaca gggtttttgc tgattcaggc 4500

ttggcctgaa aacaggacgg acctccatgc ctttgagaac ctagaaatca tacgcggcag 4560

gaccaagcaa catggtcagt tttctcttgc agtcgtcagc ctgaacataa catccttggg 4620

attacgctcc ctcaaggaga taagtgatgg agatgtgata atttcaggaa acaaaaattt 4680

gtgctatgca aatacaataa actggaaaaa actgtttggg acctccggtc agaaaaccaa 4740

aattataagc aacagaggtg aaaacagctg caaggccaca ggccaggtct gccatgcctt 4800

gtgctccccc gagggctgct ggggcccgga gcccagggac tgcgtctctt gccggaatgt 4860

cagccgaggc agggaatgcg tggacaagtg caaccttctg gagggtgagc caagggagtt 4920

tgtggagaac tctgagtgca tacagtgcca cccagagtgc ctgcctcagg ccatgaacat 4980

cacctgcaca ggacggggac cagacaactg tatccagtgt gcccactaca ttgacggccc 5040

ccactgcgtc aagacctgcc cggcaggagt catgggagaa aacaacaccc tggtctggaa 5100

gtacgcagac gccggccatg tgtgccacct gtgccatcca aactgcacct acggatgcac 5160

tgggccaggt cttgaaggct gtccaacgaa tgggcctaag atcccgtcca tcgccactgg 5220

gatggtgggg gccctcctct tgctgctggt ggtggccctg gggatcggcc tcttcatgtg 5280

agcggccgct ctagacccgg gctgcaggaa ttcgatatca agcttatcga taatcaacct 5340

ctggattaca aaatttgtga aagattgact ggtattctta actatgttgc tccttttacg 5400

ctatgtggat acgctgcttt aatgcctttg tatcatgcta ttgcttcccg tatggctttc 5460

attttctcct ccttgtataa atcctggttg ctgtctcttt atgaggagtt gtggcccgtt 5520

gtcaggcaac gtggcgtggt gtgcactgtg tttgctgacg caacccccac tggttggggc 5580

attgccacca cctgtcagct cctttccggg actttcgctt tcccctccc tattgccacg 5640

gcggaactca tcgccgcctg ccttgcccgc tgctggacag gggctcggct gttgggcact 5700

gacaattccg tggtgttgtc ggggaaatca tcgtcctttc cttggctgct cgcctgtgtt 5760

gccacctgga ttctgcgcgg gacgtccttc tgctacgtcc cttcggccct caatccagcg 5820

gaccttcctt cccgcggcct gctgccggct ctgcggcctc ttccgcgtct tcgccttcgc 5880

cctcagacga gtcggatctc cctttgggcc gcctccccgc atcgataccg tcgactagcc 5940

gtacctttaa gaccaatgac ttacaaggca gctgtagatc ttagccactt tttaaaagaa 6000

aaggggggac tggaagggct aattcactcc caaagaagac aagatctgct ttttgcctgt 6060

actgggtctc tctggttaga ccagatctga gcctgggagc tctctggcta actagggaac 6120

ccactgctta agcctcaata aagcttgcct tgagtgcttc aagtagtgtg tgcccgtctg 6180

ttgtgtgact ctggtaacta gagatccctc agacccttttt agtcagtgtg gaaaatctct 6240

agcagaattc gatatcaagc ttatcgatac cgtcgacctc gagggggggc ccggtaccca 6300

attcgcccta tagtgagtcg tattacaatt cactggccgt cgttttacaa cgtcgtgact 6360

gggaaaaccc tggcgttacc caacttaatc gccttgcagc acatcccccc ttcgccagct 6420

ggcgtaatag cgaagaggcc cgcaccgatc gcccttccca acagttgcgc agcctgaatg 6480

gcgaatggaa attgtaagcg ttaatatttt gttaaaattc gcgttaaatt tttgttaaat 6540

cagctcattt tttaaccaat aggccgaaat cggcaaaatc ccttataaat caaaagaata 6600

gaccgagata gggttgagtg ttgttccagt ttggaacaag agtccactat taaagaacgt 6660

ggactccaac gtcaaagggc gaaaaaccgt ctatcagggc gatggcccac tacgtgaacc 6720

atcaccctaa tcaagttttt tggggtcgag gtgccgtaaa gcactaaatc ggaaccctaa 6780

agggagcccc cgatttagag cttgacgggg aaagccggcg aacgtggcga gaaaggaagg 6840

gaagaaagcg aaaggagcgg gcgctagggc gctggcaagt gtagcggtca cgctgcgcgt 6900

aaccaccaca cccgccgcgc ttaatgcgcc gctacagggc gcgtcaggtg gcacttttcg 6960

gggaaatgtg cgcggaaccc ctatttgttt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc 7020

gctcatgaga caataaccct gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag 7080

tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc ctttttgcg gcattttgcc ttcctgtttt 7140

tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt 7200

gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagtttc gccccgaaga 7260

acgttttcca atgatgagca cttttaaagt tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgtat 7320

tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccg catacactat tctcagaatg acttggttga 7380

gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag aattatgcag 7440

tgctgccata accatgagtg ataacactgc ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg 7500

accgaaggag ctaaccgctt ttttgcacaa catgggggat catgtaactc gccttgatcg 7560

ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt 7620

agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg 7680

gcaacaatta atagactgga tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc 7740

ccttccggct ggctggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcgg 7800

tatcattgca gcactggggc cagatggtaa gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac 7860

ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact 7920

gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt ttactcatat atactttaga ttgatttaaa 7980

acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa 8040

aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg 8100

atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc 8160

gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actcttttc cgaaggtaac 8220

tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac tgttcttcta gtgtagccgt agttaggcca 8280

ccacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctcgct ctgctaatcc tgttaccagt 8340

ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc 8400

ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg 8460

aacgacctac accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc 8520

cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac 8580

gagggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct 8640

ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcaggggggg cggagcctat ggaaaaacgc 8700

cagcaacgcg gccttttac ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt 8760

tcctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac 8820

cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg 8880

cccaatacgc aaaccgcctc tccccgcgcg ttggccgatt cattaatgca gctggcacga 8940

caggtttccc gactggaaag cgggcagtga gcgcaacgca attaatgtga gttagctcac 9000

tcattaggca ccccaggctt tacactttat gcttccggct cgtatgttgt gtggaattgt 9060

gagcggataa caatttcaca caggaaacag ctatgaccat gattacgcca agctcgaaat 9120

taaccctcac taaagggaac aaaagctgga gctccaccgc ggtggcggcc tcgaggtcga 9180

gatccggtcg accagcaacc atagtcccgc ccctaactcc gcccatcccg cccctaactc 9240

cgcccagttc cgcccattct ccgccccatg gctgactaat ttttttatt tatgcagagg 9300

ccgaggccgc ctcggcctct gagctattcc agaagtagtg aggaggcttt tttggaggcc 9360

taggcttttg caaaaagctt cgacggtatc gattggctca tgtccaacat taccgccatg 9420

ttgacattga ttattgacta gttattaata gtaatcaatt acggggtcat tagttcatag 9480

cccatatatg gagttccgcg ttacataact tacggtaaat ggcccgcctg gctgaccgcc 9540

caacgacccc cgcccattga cgtcaataat gacgtatgtt cccatagtaa cgccaatagg 9600

gactttccat tgacgtcaat gggtggagta tttacggtaa actgcccact tggcagtaca 9660

tcaagtgtat catatgccaa gtacgccccc tattgacgtc aatgacggta aatggcccgc 9720

ctggcattat gcccagtaca tgaccttatg ggactttcct acttggcagt acatctacgt 9780

attagtcatc gctattacca tggtgatgcg gttttggcag tacatcaatg ggcgtggata 9840

gcggtttgac tcacggggat ttccaagtct ccaccccatt gacgtcaatg ggagtttgtt 9900

ttggcaccaa aatcaacggg actttccaaa atgtcgtaac aactccgccc cattgacgca 9960

aatgggcggt aggcgtgtac ggaattcgga gtggcgagcc ctcagatcct gcatataagc 10020

agctgctttt tgcctgtact gggtctctct g 10051

<210> 38
<211> 1062
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sintetica

<400> 38

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

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

Leu Val Thr Pro Gly Gly Ser Leu Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly
35 40 45

```
Phe Asp Phe Ser Ala Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
    50                  55                  60

Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ala Thr Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Lys Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Tyr Ala Thr Trp Val Asn Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn
                85                  90                  95

Ala Gln Asn Thr Val Asp Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp
            100                 105                 110

Arg Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Tyr Ala Asp Asp Gly Ala
        115                 120                 125

Leu Phe Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Ile Ser Ser Gly
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Leu
145                 150                 155                 160

Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Val Ser Ala Ala Leu Gly Ser Pro Ala
                165                 170                 175

Lys Ile Thr Cys Thr Leu Ser Ser Ala His Lys Thr Asp Thr Ile Asp
            180                 185                 190

Trp Tyr Gln Gln Leu Gln Gly Glu Ala Pro Arg Tyr Leu Met Gln Val
        195                 200                 205

Gln Ser Asp Gly Ser Tyr Thr Lys Arg Pro Gly Val Pro Asp Arg Phe
    210                 215                 220

Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Asp Arg Tyr Leu Ile Ile Pro Ser Val
225                 230                 235                 240

Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ala Asp Tyr Ile Gly
                245                 250                 255

Gly Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Thr Gly Glu Ser
            260                 265                 270

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly
        275                 280                 285

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
```

```
    290                 295                 300

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
305                 310                 315                 320

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
                325                 330                 335

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
            340                 345                 350

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
        355                 360                 365

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
    370                 375                 380

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
385                 390                 395                 400

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
                405                 410                 415

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
            420                 425                 430

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
        435                 440                 445

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val
    450                 455                 460

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
465                 470                 475                 480

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
                485                 490                 495

Leu Gly Lys Met Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala
            500                 505                 510

Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys
        515                 520                 525

Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg
    530                 535                 540
```

```
Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro
545                 550                 555                 560

Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser
                565                 570                 575

Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu
            580                 585                 590

Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg
        595                 600                 605

Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln
    610                 615                 620

Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr
625                 630                 635                 640

Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp
                645                 650                 655

Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala
            660                 665                 670

Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Leu Glu Gly Gly Gly Glu Gly
        675                 680                 685

Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro
    690                 695                 700

Arg Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His
705                 710                 715                 720

Pro Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile
                725                 730                 735

Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His
            740                 745                 750

Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val
        755                 760                 765

Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln
    770                 775                 780

Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu
785                 790                 795                 800
```

```
Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn
                805                 810                 815

Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu
            820                 825                 830

Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys
        835                 840                 845

Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys
    850                 855                 860

Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln
865                 870                 875                 880

Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr
                885                 890                 895

Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro
            900                 905                 910

Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu
        915                 920                 925

Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val
    930                 935                 940

Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala
945                 950                 955                 960

Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys
                965                 970                 975

Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly
            980                 985                 990

Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu  Val Trp Lys Tyr Ala  Asp Ala Gly
        995                 1000                1005

His Val  Cys His Leu Cys His  Pro Asn Cys Thr Tyr  Gly Cys Thr
    1010                1015                1020

Gly Pro  Gly Leu Glu Gly Cys  Pro Thr Asn Gly Pro  Lys Ile Pro
    1025                1030                1035

Ser Ile  Ala Thr Gly Met Val  Gly Ala Leu Leu Leu  Leu Leu Val
    1040                1045                1050
```

Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met
1055 1060

<210> 39
<211> 9721
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sintetica

<400> 39
gttagaccag atctgagcct gggagctctc tggctaacta gggaacccac tgcttaagcc 60

tcaataaagc ttgccttgag tgcttcaagt agtgtgtgcc cgtctgttgt gtgactctgg 120

taactagaga tccctcagac ccttttagtc agtgtggaaa atctctagca gtggcgcccg 180

aacagggact tgaaagcgaa agggaaacca gaggagctct ctcgacgcag gactcggctt 240

gctgaagcgc gcacggcaag aggcgagggg cggcgactgg tgagtacgcc aaaaattttg 300

actagcggag gctagaagga gagagatggg tgcgagagcg tcagtattaa gcgggggaga 360

attagatcga tgggaaaaaa ttcggttaag gccaggggga aagaaaaaat ataaattaaa 420

acatatagta tgggcaagca gggagctaga acgattcgca gttaatcctg gcctgttaga 480

aacatcagaa ggctgtagac aaatactggg acagctacaa ccatcccttc agacaggatc 540

agaagaactt agatcattat ataatacagt agcaaccctc tattgtgtgc atcaaaggat 600

agagataaaa gacaccaagg aagctttaga caagatagag gaagagcaaa acaaaagtaa 660

gaaaaaagca cagcaagcag cagctgacac aggacacagc aatcaggtca gccaaaatta 720

ccctatagtg cagaacatcc aggggcaaat ggtacatcag gccatatcac ctagaacttt 780

aaatgcatgg gtaaaagtag tagaagagaa ggctttcagc ccagaagtga tacccatgtt 840

ttcagcatta tcagaaggag ccaccccaca agatttaaac accatgctaa acacagtggg 900

gggacatcaa gcagccatgc aaatgttaaa agagaccatc aatgaggaag ctgcaggcaa 960

agagaagagt ggtgcagaga gaaaaaagag cagtgggaat aggagctttg ttccttgggt 1020

tcttgggagc agcaggaagc actatgggcg cagcgtcaat gacgctgacg gtacaggcca 1080

gacaattatt gtctggtata gtgcagcagc agaacaattt gctgagggct attgaggcgc 1140

aacagcatct gttgcaactc acagtctggg gcatcaagca gctccaggca agaatcctgg 1200

ctgtggaaag atacctaaag gatcaacagc tcctggggat ttggggttgc tctggaaaac 1260

tcatttgcac cactgctgtg ccttggatct acaaatggca gtattcatcc acaattttaa 1320

aagaaaaggg gggattgggg ggtacagtgc aggggaaaga atagtagaca taatagcaac 1380

agacatacaa actaaagaat tacaaaaaca aattacaaaa attcaaaatt ttcgggttta 1440

ttacagggac agcagagatc cagtttgggg atcaattgca tgaagaatct gcttagggtt 1500

aggcgttttg cgctgcttcg cgaggatctg cgatcgctcc ggtgcccgtc agtgggcaga 1560

gcgcacatcg cccacagtcc ccgagaagtt ggggggaggg gtcggcaatt gaaccggtgc 1620

ctagagaagg tggcgcgggg taaactggga aagtgatgtc gtgtactggc tccgcctttt 1680

tcccgagggt gggggagaac cgtatataag tgcagtagtc gccgtgaacg ttctttttcg 1740

caacgggttt gccgccagaa cacagctgaa gcttcgaggg gctcgcatct ctccttcacg 1800

cgcccgccgc cctacctgag gccgccatcc acgccggttg agtcgcgttc tgccgcctcc 1860

cgcctgtggt gcctcctgaa ctgcgtccgc cgtctaggta agtttaaagc tcaggtcgag 1920

accgggcctt tgtccggcgc tcccttggag cctacctaga ctcagccggc tctccacgct 1980

ttgcctgacc ctgcttgctc aactctacgt ctttgtttcg ttttctgttc tgcgccgtta 2040

cagatccaag ctgtgaccgg cgcctacggc tagcgaattc ctcgaggcca ccatgctgct 2100

gctggtgaca agcctgctgc tgtgcgagct gccccacccc gcctttctgc tgatccccca 2160

ggaacagctc gtcgaaagcg gcggcagact ggtgacacct ggcggcagcc tgaccctgag 2220

ctgcaaggcc agcggcttcg acttcagcgc ctactacatg agctgggtcc gccaggcccc 2280

tggcaaggga ctggaatgga tcgccaccat ctaccccagc agcggcaaga cctactacgc 2340

cacctgggtg aacggacggt tcaccatctc cagcgacaac gcccagaaca ccgtggacct 2400

gcagatgaac agcctgacag ccgccgaccg ggccacctac ttttgcgcca gagacagcta 2460

cgccgacgac ggcgccctgt tcaacatctg gggccctggc accctggtga caatctctag 2520

cggcggaggc ggatctggtg gcggaggaag tggcggcgga ggatctgagc tggtgctgac 2580

ccagagcccc tctgtgtctg ctgccctggg aagccctgcc aagatcacct gtaccctgag 2640

cagcgcccac aagaccgaca ccatcgactg gtatcagcag ctgcagggcg aggcccccag 2700

atacctgatg caggtgcaga gcgacggcag ctacaccaag aggccaggcg tgcccgaccg 2760

gttcagcgga tctagctctg gcgccgaccg ctacctgatc atccccagcg tgcaggccga 2820

tgacgaggcc gattactact gtggcgccga ctacatcggc ggctacgtgt tcggcggagg 2880

cacccagctg accgtgaccg gcgagtctaa gtacggaccg ccctgccccc cttgccctgg 2940

ccagcctcgc gagccccagg tgtacaccct gcctccctcc caggaagaga tgaccaagaa 3000

ccaggtgtcc ctgacctgcc tggtgaaggg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg 3060

ggagagcaac ggccagcctg agaacaacta caagaccacc cctcccgtgc tggacagcga 3120

cggcagcttc ttcctgtaca gccggctgac cgtggacaag agccggtggc aggaaggcaa 3180

cgtctttagc tgcagcgtga tgcacgaggc cctgcacaac cactacaccc agaagagcct 3240

gagcctgtcc ctgggcaaga tgttctgggt gctggtggtg gtgggcgggg tgctggcctg 3300

ctacagcctg ctggtgacag tggccttcat catcttttgg gtgaaacggg gcagaaagaa 3360

actcctgtat atattcaaac aaccatttat gagaccagta caaactactc aagaggaaga 3420

tggctgtagc tgccgatttc cagaagaaga agaaggagga tgtgaactgc gggtgaagtt 3480

cagcagaagc gccgacgccc ctgcctacca gcagggccag aatcagctgt acaacgagct 3540

gaacctgggc agaagggaag agtacgacgt cctggataag cggagaggcc gggaccctga 3600

gatgggcggc aagcctcggc ggaagaaccc ccaggaaggc ctgtataacg aactgcagaa 3660

agacaagatg gccgaggcct acagcgagat cggcatgaag ggcgagcgga ggcggggcaa 3720

gggccacgac ggcctgtatc agggcctgtc caccgccacc aaggatacct acgacgccct 3780

gcacatgcag gccctgcccc caaggctcga gggcggcgga gagggcagag gaagtcttct 3840

aacatgcggt gacgtggagg agaatcccgg ccctaggatg cttctcctgg tgacaagcct 3900

tctgctctgt gagttaccac acccagcatt cctcctgatc ccacgcaaag tgtgtaacgg 3960

aataggtatt ggtgaattta aagactcact ctccataaat gctacgaata ttaaacactt 4020

caaaaactgc acctccatca gtggcgatct ccacatcctg ccggtggcat ttaggggtga 4080

ctccttcaca catactcctc ctctggatcc acaggaactg gatattctga aaaccgtaaa 4140

ggaaatcaca gggtttttgc tgattcaggc ttggcctgaa aacaggacgg acctccatgc 4200

ctttgagaac ctagaaatca tacgcggcag gaccaagcaa catggtcagt tttctcttgc 4260

agtcgtcagc ctgaacataa catccttggg attacgctcc ctcaaggaga taagtgatgg 4320

agatgtgata atttcaggaa acaaaaattt gtgctatgca aatacaataa actggaaaaa 4380

actgtttggg acctccggtc agaaaaccaa aattataagc aacagaggtg aaaacagctg 4440

caaggccaca ggccaggtct gccatgcctt gtgctccccc gagggctgct ggggcccgga 4500

gcccagggac tgcgtctctt gccggaatgt cagccgaggc agggaatgcg tggacaagtg 4560

caaccttctg gagggtgagc caagggagtt tgtggagaac tctgagtgca tacagtgcca 4620

cccagagtgc ctgcctcagg ccatgaacat cacctgcaca ggacggggac cagacaactg 4680

tatccagtgt gcccactaca ttgacggccc ccactgcgtc aagacctgcc cggcaggagt 4740

catgggagaa aacaacaccc tggtctggaa gtacgcagac gccggccatg tgtgccacct 4800

gtgccatcca aactgcacct acggatgcac tgggccaggt cttgaaggct gtccaacgaa 4860

tgggcctaag atcccgtcca tcgccactgg gatggtgggg gccctcctct tgctgctggt 4920

ggtggccctg gggatcggcc tcttcatgtg agcggccgct ctagacccgg gctgcaggaa 4980

ttcgatatca agcttatcga taatcaacct ctggattaca aaatttgtga aagattgact 5040

ggtattctta actatgttgc tccttttacg ctatgtggat acgctgcttt aatgcctttg 5100

tatcatgcta ttgcttcccg tatggctttc attttctcct ccttgtataa atcctggttg 5160

ctgtctcttt atgaggagtt gtggcccgtt gtcaggcaac gtggcgtggt gtgcactgtg 5220

tttgctgacg caacccccac tggttggggc attgccacca cctgtcagct cctttccggg 5280

actttcgctt tccccctccc tattgccacg gcggaactca tcgccgcctg ccttgcccgc 5340

tgctggacag gggctcggct gttgggcact gacaattccg tggtgttgtc ggggaaatca 5400

tcgtcctttc cttggctgct cgcctgtgtt gccacctgga ttctgcgcgg gacgtccttc 5460

tgctacgtcc cttcggccct caatccagcg gaccttcctt cccgcggcct gctgccggct 5520

ctgcggcctc ttccgcgtct tcgccttcgc cctcagacga gtcggatctc cctttgggcc 5580

gcctccccgc atcgataccg tcgactagcc gtacctttaa gaccaatgac ttacaaggca 5640

gctgtagatc ttagccactt tttaaaagaa aaggggggac tggaagggct aattcactcc 5700

caaagaagac aagatctgct ttttgcctgt actgggtctc tctggttaga ccagatctga 5760

gcctgggagc tctctggcta actagggaac ccactgctta agcctcaata aagcttgcct 5820

tgagtgcttc aagtagtgtg tgcccgtctg ttgtgtgact ctggtaacta gagatccctc 5880

agacccttttt agtcagtgtg gaaaatctct agcagaattc gatatcaagc ttatcgatac 5940

cgtcgacctc gagggggggc ccggtaccca attcgcccta tagtgagtcg tattacaatt 6000

cactggccgt cgttttacaa cgtcgtgact gggaaaaccc tggcgttacc caacttaatc 6060

gccttgcagc acatcccccc ttcgccagct ggcgtaatag cgaagaggcc cgcaccgatc 6120

gcccttccca acagttgcgc agcctgaatg gcgaatggaa attgtaagcg ttaatatttt 6180

gttaaaattc gcgttaaatt tttgttaaat cagctcattt tttaaccaat aggccgaaat 6240

cggcaaaatc ccttataaat caaaagaata gaccgagata gggttgagtg ttgttccagt 6300

ttggaacaag agtccactat taaagaacgt ggactccaac gtcaaagggc gaaaaaccgt 6360

ctatcagggc gatggcccac tacgtgaacc atcaccctaa tcaagttttt tggggtcgag 6420

gtgccgtaaa gcactaaatc ggaaccctaa agggagcccc cgatttagag cttgacgggg 6480

aaagccggcg aacgtggcga gaaaggaagg gaagaaagcg aaaggagcgg gcgctagggc 6540

gctggcaagt gtagcggtca cgctgcgcgt aaccaccaca cccgccgcgc ttaatgcgcc 6600

gctacagggc gcgtcaggtg gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaaccc ctatttgttt 6660

atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct 6720

tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc 6780

ctttttgcg gcattttgcc ttcctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa 6840

agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg 6900

taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaagt 6960

tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgtat tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccg 7020

catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac 7080

ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc 7140

ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgcacaa 7200

catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc 7260

aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt 7320

aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga 7380

taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa 7440

atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcgg tatcattgca gcactggggc cagatggtaa 7500

gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa 7560

tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt 7620

ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt 7680

gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg 7740

agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt 7800

aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca 7860

agagctacca actcttttte cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac 7920

tgttcttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac 7980

atacctcgct ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct 8040

taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg 8100

gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca 8160

gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt 8220

aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta 8280

tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc 8340

gtcaggggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gccttttac ggttcctggc 8400

cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tcctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa 8460

ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag 8520

cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cccaatacgc aaaccgcctc tccccgcgcg 8580

ttggccgatt cattaatgca gctggcacga caggtttccc gactggaaag cgggcagtga 8640

gcgcaacgca attaatgtga gttagctcac tcattaggca ccccaggctt tacactttat 8700

gcttccggct cgtatgttgt gtggaattgt gagcggataa caatttcaca caggaaacag 8760

ctatgaccat gattacgcca agctcgaaat taaccctcac taaagggaac aaaagctgga 8820

gctccaccgc ggtggcggcc tcgaggtcga gatccggtcg accagcaacc atagtcccgc 8880

ccctaactcc gcccatcccg cccctaactc cgcccagttc cgcccattct ccgccccatg 8940

gctgactaat ttttttatt tatgcagagg ccgaggccgc ctcggcctct gagctattcc 9000

agaagtagtg aggaggcttt tttggaggcc taggcttttg caaaaagctt cgacggtatc 9060

gattggctca tgtccaacat taccgccatg ttgacattga ttattgacta gttattaata 9120

gtaatcaatt acggggtcat tagttcatag cccatatatg gagttccgcg ttacataact 9180

tacggtaaat ggcccgcctg gctgaccgcc caacgacccc cgcccattga cgtcaataat 9240

gacgtatgtt cccatagtaa cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat gggtggagta 9300

tttacggtaa actgcccact tggcagtaca tcaagtgtat catatgccaa gtacgccccc 9360

tattgacgtc aatgacggta aatggcccgc ctggcattat gcccagtaca tgaccttatg 9420

ggactttcct acttggcagt acatctacgt attagtcatc gctattacca tggtgatgcg 9480

gttttggcag tacatcaatg ggcgtggata gcggtttgac tcacggggat ttccaagtct 9540

ccaccccatt gacgtcaatg ggagtttgtt ttggcaccaa aatcaacggg actttccaaa 9600

atgtcgtaac aactccgccc cattgacgca aatgggcggt aggcgtgtac ggaattcgga 9660

gtggcgagcc ctcagatcct gcatataagc agctgctttt tgcctgtact gggtctctct 9720

g 9721

<210> 40
<211> 952
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sintetica

<400> 40

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

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

Leu Val Thr Pro Gly Gly Ser Leu Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly
35 40 45

Phe Asp Phe Ser Ala Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
50 55 60

Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ala Thr Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Tyr Ala Thr Trp Val Asn Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn
85 90 95

Ala Gln Asn Thr Val Asp Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp
100 105 110

```
Arg Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Tyr Ala Asp Asp Gly Ala
        115                 120                 125

Leu Phe Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Ile Ser Ser Gly
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Leu
145                 150                 155                 160

Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Val Ser Ala Ala Leu Gly Ser Pro Ala
                165                 170                 175

Lys Ile Thr Cys Thr Leu Ser Ser Ala His Lys Thr Asp Thr Ile Asp
            180                 185                 190

Trp Tyr Gln Gln Leu Gln Gly Glu Ala Pro Arg Tyr Leu Met Gln Val
        195                 200                 205

Gln Ser Asp Gly Ser Tyr Thr Lys Arg Pro Gly Val Pro Asp Arg Phe
    210                 215                 220

Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Asp Arg Tyr Leu Ile Ile Pro Ser Val
225                 230                 235                 240

Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ala Asp Tyr Ile Gly
                245                 250                 255

Gly Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Thr Gly Glu Ser
            260                 265                 270

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Gly Gln Pro Arg Glu Pro
        275                 280                 285

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
    290                 295                 300

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
305                 310                 315                 320

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
                325                 330                 335

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
            340                 345                 350

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
```

```
        355                 360                 365

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
    370                 375                 380

Leu Ser Leu Gly Lys Met Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val
385                 390                 395                 400

Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp
                405                 410                 415

Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe
            420                 425                 430

Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg
        435                 440                 445

Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser
    450                 455                 460

Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
465                 470                 475                 480

Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
                485                 490                 495

Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
            500                 505                 510

Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
        515                 520                 525

Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
    530                 535                 540

His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
545                 550                 555                 560

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Leu Glu Gly Gly Gly
                565                 570                 575

Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro
            580                 585                 590

Gly Pro Arg Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu
        595                 600                 605
```

```
Pro His Pro Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile
    610                 615                 620

Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile
625                 630                 635                 640

Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu
                645                 650                 655

Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp
            660                 665                 670

Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe
        675                 680                 685

Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe
    690                 695                 700

Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe
705                 710                 715                 720

Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser
                725                 730                 735

Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn
            740                 745                 750

Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser
        755                 760                 765

Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys
    770                 775                 780

Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp
785                 790                 795                 800

Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly
                805                 810                 815

Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu
            820                 825                 830

Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro
        835                 840                 845

Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile
    850                 855                 860
```

Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro
865 870 875 880

Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp
885 890 895

Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys
900 905 910

Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro
915 920 925

Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val
930 935 940

Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met
945 950

<210> 41
<211> 9400
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sintetica

<400> 41
gttagaccag atctgagcct gggagctctc tggctaacta gggaacccac tgcttaagcc 60

tcaataaagc ttgccttgag tgcttcaagt agtgtgtgcc cgtctgttgt gtgactctgg 120

taactagaga tccctcagac ccttttagtc agtgtggaaa atctctagca gtggcgcccg 180

aacagggact tgaaagcgaa agggaaacca gaggagctct ctcgacgcag gactcggctt 240

gctgaagcgc gcacggcaag aggcgagggg cggcgactgg tgagtacgcc aaaaattttg 300

actagcggag gctagaagga gagagatggg tgcgagagcg tcagtattaa gcgggggaga 360

attagatcga tgggaaaaaa ttcggttaag gccaggggga aagaaaaaat ataaattaaa 420

acatatagta tgggcaagca gggagctaga acgattcgca gttaatcctg gcctgttaga 480

aacatcagaa ggctgtagac aaatactggg acagctacaa ccatcccttc agacaggatc 540

agaagaactt agatcattat ataatacagt agcaaccctc tattgtgtgc atcaaaggat 600

agagataaaa gacaccaagg aagctttaga caagatagag gaagagcaaa acaaaagtaa 660

gaaaaaagca cagcaagcag cagctgacac aggacacagc aatcaggtca gccaaaatta 720

ccctatagtg cagaacatcc aggggcaaat ggtacatcag gccatatcac ctagaacttt 780

aaatgcatgg gtaaaagtag tagaagagaa ggctttcagc ccagaagtga tacccatgtt 840

ttcagcatta tcagaaggag ccaccccaca agatttaaac accatgctaa acacagtggg 900

gggacatcaa gcagccatgc aaatgttaaa agagaccatc aatgaggaag ctgcaggcaa 960

agagaagagt ggtgcagaga gaaaaaagag cagtgggaat aggagctttg ttccttgggt 1020

tcttgggagc agcaggaagc actatgggcg cagcgtcaat gacgctgacg gtacaggcca 1080

gacaattatt gtctggtata gtgcagcagc agaacaattt gctgagggct attgaggcgc 1140

aacagcatct gttgcaactc acagtctggg gcatcaagca gctccaggca agaatcctgg 1200

ctgtggaaag atacctaaag gatcaacagc tcctggggat ttggggttgc tctggaaaac 1260

tcatttgcac cactgctgtg ccttggatct acaaatggca gtattcatcc acaattttaa 1320

aagaaaaggg gggattgggg ggtacagtgc aggggaaaga atagtagaca taatagcaac 1380

agacatacaa actaaagaat tacaaaaaca aattacaaaa attcaaaatt ttcgggttta 1440

ttacagggac agcagagatc cagtttgggg atcaattgca tgaagaatct gcttagggtt 1500

aggcgttttg cgctgcttcg cgaggatctg cgatcgctcc ggtgcccgtc agtgggcaga 1560

gcgcacatcg cccacagtcc ccgagaagtt ggggggaggg gtcggcaatt gaaccggtgc 1620

ctagagaagg tggcgcgggg taaactggga aagtgatgtc gtgtactggc tccgcctttt 1680

tcccgagggt gggggagaac cgtatataag tgcagtagtc gccgtgaacg ttcttttcg 1740

caacgggttt gccgccagaa cacagctgaa gcttcgaggg gctcgcatct ctccttcacg 1800

cgcccgccgc cctacctgag gccgccatcc acgccggttg agtcgcgttc tgccgcctcc 1860

cgcctgtggt gcctcctgaa ctgcgtccgc cgtctaggta agtttaaagc tcaggtcgag 1920

accgggcctt tgtccggcgc tcccttggag cctacctaga ctcagccggc tctccacgct 1980

ttgcctgacc ctgcttgctc aactctacgt ctttgtttcg ttttctgttc tgcgccgtta 2040

cagatccaag ctgtgaccgg cgcctacggc tagcgaattc ctcgaggcca ccatgctgct 2100

gctggtgaca agcctgctgc tgtgcgagct gccccacccc gcctttctgc tgatccccca 2160

ggaacagctc gtcgaaagcg gcggcagact ggtgacacct ggcggcagcc tgaccctgag 2220

ctgcaaggcc agcggcttcg acttcagcgc ctactacatg agctgggtcc gccaggcccc 2280

tggcaaggga ctggaatgga tcgccaccat ctaccccagc agcggcaaga cctactacgc 2340

cacctgggtg aacggacggt tcaccatctc cagcgacaac gcccagaaca ccgtggacct 2400

gcagatgaac agcctgacag ccgccgaccg ggccacctac ttttgcgcca gagacagcta 2460

cgccgacgac ggcgccctgt tcaacatctg gggccctggc accctggtga caatctctag 2520

cggcggaggc ggatctggtg gcggaggaag tggcggcgga ggatctgagc tggtgctgac 2580

ccagagcccc tctgtgtctg ctgccctggg aagccctgcc aagatcacct gtaccctgag 2640

cagcgcccac aagaccgaca ccatcgactg gtatcagcag ctgcagggcg aggcccccag 2700

atacctgatg caggtgcaga gcgacggcag ctacaccaag aggccaggcg tgcccgaccg 2760

gttcagcgga tctagctctg gcgccgaccg ctacctgatc atccccagcg tgcaggccga 2820

tgacgaggcc gattactact gtggcgccga ctacatcggc ggctacgtgt tcggcggagg 2880

cacccagctg accgtgaccg gcgagtctaa gtacggaccg ccctgccccc cttgccctat 2940

gttctgggtg ctggtggtgg tgggcggggt gctggcctgc tacagcctgc tggtgacagt 3000

ggccttcatc atcttttggg tgaaacgggg cagaaagaaa ctcctgtata tattcaaaca 3060

accatttatg agaccagtac aaactactca agaggaagat ggctgtagct gccgatttcc 3120

agaagaagaa gaaggaggat gtgaactgcg ggtgaagttc agcagaagcg ccgacgcccc 3180

tgcctaccag cagggccaga atcagctgta caacgagctg aacctgggca gaagggaaga 3240

gtacgacgtc ctggataagc ggagaggccg ggaccctgag atgggcggca agcctcggcg 3300

gaagaacccc caggaaggcc tgtataacga actgcagaaa gacaagatgg ccgaggccta 3360

cagcgagatc ggcatgaagg gcgagcggag gcggggcaag ggccacgacg gcctgtatca 3420

gggcctgtcc accgccacca aggataccta cgacgccctg cacatgcagg ccctgccccc 3480

aaggctcgag ggcggcggag agggcagagg aagtcttcta acatgcggtg acgtggagga 3540

gaatcccggc cctaggatgc ttctcctggt gacaagcctt ctgctctgtg agttaccaca 3600

cccagcattc ctcctgatcc cacgcaaagt gtgtaacgga ataggtattg gtgaatttaa 3660

agactcactc tccataaatg ctacgaatat taaacacttc aaaaactgca cctccatcag 3720

tggcgatctc cacatcctgc cggtggcatt taggggtgac tccttcacac atactcctcc 3780

tctggatcca caggaactgg atattctgaa aaccgtaaag gaaatcacag ggtttttgct 3840

gattcaggct tggcctgaaa acaggacgga cctccatgcc tttgagaacc tagaaatcat 3900

acgcggcagg accaagcaac atggtcagtt ttctcttgca gtcgtcagcc tgaacataac 3960

atccttggga ttacgctccc tcaaggagat aagtgatgga gatgtgataa tttcaggaaa 4020

caaaaatttg tgctatgcaa atacaataaa ctggaaaaaa ctgtttggga cctccggtca 4080

gaaaaccaaa attataagca acagaggtga aaacagctgc aaggccacag gccaggtctg 4140

ccatgccttg tgctcccccg agggctgctg gggcccggag cccagggact gcgtctcttg 4200

ccggaatgtc agccgaggca gggaatgcgt ggacaagtgc aaccttctgg agggtgagcc 4260

aagggagttt gtggagaact ctgagtgcat acagtgccac ccagagtgcc tgcctcaggc 4320

catgaacatc acctgcacag gacggggacc agacaactgt atccagtgtg cccactacat 4380

tgacggcccc cactgcgtca agacctgccc ggcaggagtc atgggagaaa acaacaccct 4440

ggtctggaag tacgcagacg ccggccatgt gtgccacctg tgccatccaa actgcaccta 4500

cggatgcact gggccaggtc ttgaaggctg tccaacgaat gggcctaaga tcccgtccat 4560

cgccactggg atggtggggg ccctcctctt gctgctggtg gtggccctgg ggatcggcct 4620

cttcatgtga gcggccgctc tagacccggg ctgcaggaat tcgatatcaa gcttatcgat 4680

aatcaacctc tggattacaa aatttgtgaa agattgactg gtattcttaa ctatgttgct 4740

cctttacgc tatgtggata cgctgcttta atgcctttgt atcatgctat tgcttcccgt 4800

atggctttca ttttctcctc cttgtataaa tcctggttgc tgtctcttta tgaggagttg 4860

tggcccgttg tcaggcaacg tggcgtggtg tgcactgtgt ttgctgacgc aacccccact 4920

ggttggggca ttgccaccac ctgtcagctc ctttccggga ctttcgcttt ccccctccct 4980

attgccacgg cggaactcat cgccgcctgc cttgcccgct gctggacagg ggctcggctg 5040

ttgggcactg acaattccgt ggtgttgtcg gggaaatcat cgtcctttcc ttggctgctc 5100

gcctgtgttg ccacctggat tctgcgcggg acgtccttct gctacgtccc ttcggccctc 5160

aatccagcgg accttccttc ccgcggcctg ctgccggctc tgcggcctct tccgcgtctt 5220

cgccttcgcc ctcagacgag tcggatctcc ctttgggccg cctccccgca tcgataccgt 5280

cgactagccg taccttttaag accaatgact tacaaggcag ctgtagatct tagccacttt 5340

ttaaaagaaa aggggggact ggaagggcta attcactccc aaagaagaca agatctgctt 5400

tttgcctgta ctgggtctct ctggttagac cagatctgag cctgggagct ctctggctaa 5460

ctagggaacc cactgcttaa gcctcaataa agcttgcctt gagtgcttca agtagtgtgt 5520

gcccgtctgt tgtgtgactc tggtaactag agatccctca gacccttta gtcagtgtgg 5580

aaaatctcta gcagaattcg atatcaagct tatcgatacc gtcgacctcg agggggggcc 5640

cggtacccaa ttcgccctat agtgagtcgt attacaattc actggccgtc gttttacaac 5700

gtcgtgactg ggaaaaccct ggcgttaccc aacttaatcg ccttgcagca catcccccctt 5760

tcgccagctg gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg cccttcccaa cagttgcgca 5820

gcctgaatgg cgaatggaaa ttgtaagcgt taatattttg ttaaaattcg cgttaaattt 5880

ttgttaaatc agctcatttt ttaaccaata ggccgaaatc ggcaaaatcc cttataaatc 5940

aaaagaatag accgagatag ggttgagtgt tgttccagtt tggaacaaga gtccactatt 6000

aaagaacgtg gactccaacg tcaaagggcg aaaaaccgtc tatcagggcg atggcccact 6060

acgtgaacca tcaccctaat caagtttttt ggggtcgagg tgccgtaaag cactaaatcg 6120

gaaccctaaa gggagccccc gatttagagc ttgacgggga aagccggcga acgtggcgag 6180

aaaggaaggg aagaaagcga aaggagcggg cgctagggcg ctggcaagtg tagcggtcac 6240

gctgcgcgta accaccacac ccgccgcgct taatgcgccg ctacagggcg cgtcaggtgg 6300

cacttttcgg ggaaatgtgc gcggaacccc tatttgttta ttttctaaa tacattcaaa 6360

tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa 6420

gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc ccttattccc ttttttgcgg catttgcct 6480

tcctgttttt gctcacccag aaacgctggt gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg 6540

tgcacgagtg ggttacatcg aactggatct caacagcggt aagatccttg agagttttcg 6600

ccccgaagaa cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcggtatt 6660

atcccgtatt gacgccgggc aagagcaact cggtcgccgc atacactatt ctcagaatga 6720

cttggttgag tactcaccag tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga 6780

attatgcagt gctgccataa ccatgagtga taacactgcg gccaacttac ttctgacaac 6840

gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt tttgcacaac atgggggatc atgtaactcg 6900

ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac 6960

gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta actggcgaac tacttactct 7020

agcttcccgg caacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct 7080

gcgctcggcc cttccggctg gctggtttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg 7140

gtctcgcggt atcattgcag cactggggcc agatggtaag ccctcccgta tcgtagttat 7200

ctacacgacg gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg 7260

tgcctcactg attaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tactttagat 7320

tgatttaaaa cttcattttt aatttaaaag gatctaggtg aagatccttt ttgataatct 7380

catgaccaaa atcccttaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa 7440

gatcaaagga tcttcttgag atccttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa 7500

aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc 7560

gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gttcttctag tgtagccgta 7620

gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaatcct 7680

gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg 7740

atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag 7800

cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc 7860

cacgcttccc gaagggagaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg 7920

agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt 7980

tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg 8040

gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca 8100

catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac cgtattaccg cctttgagtg 8160

agctgatacc gctcgccgca gccgaacgac cgagcgcagc gagtcagtga gcgaggaagc 8220

ggaagagcgc ccaatacgca aaccgcctct ccccgcgcgt tggccgattc attaatgcag 8280

ctggcacgac aggtttcccg actggaaagc gggcagtgag cgcaacgcaa ttaatgtgag 8340

ttagctcact cattaggcac cccaggcttt acactttatg cttccggctc gtatgttgtg 8400

tggaattgtg agcggataac aatttcacac aggaaacagc tatgaccatg attacgccaa 8460

gctcgaaatt aaccctcact aaagggaaca aaagctggag ctccaccgcg gtggcggcct 8520

cgaggtcgag atccggtcga ccagcaacca tagtcccgcc cctaactccg cccatcccgc 8580

ccctaactcc gcccagttcc gcccattctc cgccccatgg ctgactaatt ttttttattt 8640

atgcagaggc cgaggccgcc tcggcctctg agctattcca gaagtagtga ggaggctttt 8700

ttggaggcct aggcttttgc aaaaagcttc gacggtatcg attggctcat gtccaacatt 8760

accgccatgt tgacattgat tattgactag ttattaatag taatcaatta cggggtcatt 8820

agttcatagc ccatatatgg agttccgcgt tacataactt acggtaaatg gcccgcctgg 8880

ctgaccgccc aacgacccccc gcccattgac gtcaataatg acgtatgttc ccatagtaac 8940

gccaataggg actttccatt gacgtcaatg ggtggagtat ttacggtaaa ctgcccactt 9000

ggcagtacat caagtgtatc atatgccaag tacgcccccc attgacgtca atgacggtaa 9060

atggcccgcc tggcattatg cccagtacat gaccttatgg gactttccta cttggcagta 9120

catctacgta ttagtcatcg ctattaccat ggtgatgcgg ttttggcagt acatcaatgg 9180

gcgtggatag cggtttgact cacggggatt tccaagtctc caccccattg acgtcaatgg 9240

gagtttgttt tggcaccaaa atcaacggga ctttccaaaa tgtcgtaaca actccgcccc 9300

attgacgcaa atgggcggta ggcgtgtacg gaattcggag tggcgagccc tcagatcctg 9360

catataagca gctgcttttt gcctgtactg ggtctctctg 9400

<210> 42
<211> 845
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sintetica

<400> 42

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

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

Leu Val Thr Pro Gly Gly Ser Leu Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly
35 40 45

Phe Asp Phe Ser Ala Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
50 55 60

Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ala Thr Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Lys Thr
65 70 75 80

```
Tyr Tyr Ala Thr Trp Val Asn Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn
                85                  90                  95

Ala Gln Asn Thr Val Asp Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp
            100                 105                 110

Arg Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Tyr Ala Asp Asp Gly Ala
        115                 120                 125

Leu Phe Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Ile Ser Ser Gly
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Leu
145                 150                 155                 160

Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Val Ser Ala Ala Leu Gly Ser Pro Ala
                165                 170                 175

Lys Ile Thr Cys Thr Leu Ser Ser Ala His Lys Thr Asp Thr Ile Asp
            180                 185                 190

Trp Tyr Gln Gln Leu Gln Gly Glu Ala Pro Arg Tyr Leu Met Gln Val
        195                 200                 205

Gln Ser Asp Gly Ser Tyr Thr Lys Arg Pro Gly Val Pro Asp Arg Phe
    210                 215                 220

Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Asp Arg Tyr Leu Ile Ile Pro Ser Val
225                 230                 235                 240

Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ala Asp Tyr Ile Gly
                245                 250                 255

Gly Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Thr Gly Glu Ser
            260                 265                 270

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Met Phe Trp Val Leu Val
        275                 280                 285

Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala
    290                 295                 300

Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile
305                 310                 315                 320

Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp
                325                 330                 335
```

```
Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
            340                 345                 350

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
        355                 360                 365

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
    370                 375                 380

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
385                 390                 395                 400

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

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
            420                 425                 430

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
        435                 440                 445

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
    450                 455                 460

Leu Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp
465                 470                 475                 480

Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu
                485                 490                 495

Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys
            500                 505                 510

Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile
        515                 520                 525

Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly
    530                 535                 540

Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His
545                 550                 555                 560

Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys
                565                 570                 575

Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr
```

```
            580                 585                 590

Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys
        595                 600                 605

Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser
    610                 615                 620

Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile
625                 630                 635                 640

Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys
                645                 650                 655

Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly
            660                 665                 670

Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser
        675                 680                 685

Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg
    690                 695                 700

Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu
705                 710                 715                 720

Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His
                725                 730                 735

Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly
            740                 745                 750

Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys
        755                 760                 765

Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val
    770                 775                 780

Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn
785                 790                 795                 800

Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn
                805                 810                 815

Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu
            820                 825                 830
```

Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met
835 840 845

<210> 43
<211> 10015
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sintetica

<400> 43
gttagaccag atctgagcct gggagctctc tggctaacta gggaacccac tgcttaagcc 60

tcaataaagc ttgccttgag tgcttcaagt agtgtgtgcc cgtctgttgt gtgactctgg 120

taactagaga tccctcagac ccttttagtc agtgtggaaa atctctagca gtggcgcccg 180

aacagggact tgaaagcgaa agggaaacca gaggagctct ctcgacgcag gactcggctt 240

gctgaagcgc gcacggcaag aggcgagggg cggcgactgg tgagtacgcc aaaaattttg 300

actagcggag gctagaagga gagagatggg tgcgagagcg tcagtattaa gcgggggaga 360

attagatcga tgggaaaaaa ttcggttaag gccaggggga aagaaaaaat ataaattaaa 420

acatatagta tgggcaagca gggagctaga acgattcgca gttaatcctg gcctgttaga 480

aacatcagaa ggctgtagac aaatactggg acagctacaa ccatcccttc agacaggatc 540

agaagaactt agatcattat ataatacagt agcaaccctc tattgtgtgc atcaaaggat 600

agagataaaa gacaccaagg aagctttaga caagatagag gaagagcaaa acaaaagtaa 660

gaaaaaagca cagcaagcag cagctgacac aggacacagc aatcaggtca gccaaaatta 720

ccctatagtg cagaacatcc aggggcaaat ggtacatcag gccatatcac ctagaacttt 780

aaatgcatgg gtaaaagtag tagaagagaa ggctttcagc ccagaagtga tacccatgtt 840

ttcagcatta tcagaaggag ccaccccaca agatttaaac accatgctaa acacagtggg 900

gggacatcaa gcagccatgc aaatgttaaa agagaccatc aatgaggaag ctgcaggcaa 960

agagaagagt ggtgcagaga gaaaaaagag cagtgggaat aggagctttg ttccttgggt 1020

tcttgggagc agcaggaagc actatgggcg cagcgtcaat gacgctgacg gtacaggcca 1080

gacaattatt gtctggtata gtgcagcagc agaacaattt gctgagggct attgaggcgc 1140

aacagcatct gttgcaactc acagtctggg gcatcaagca gctccaggca agaatcctgg 1200

ctgtggaaag atacctaaag gatcaacagc tcctggggat ttggggttgc tctggaaaac 1260

tcatttgcac cactgctgtg ccttggatct acaaatggca gtattcatcc acaattttaa 1320

aagaaaaggg gggattgggg ggtacagtgc aggggaaaga atagtagaca taatagcaac 1380

agacatacaa actaaagaat tacaaaaaca aattacaaaa attcaaaatt ttcgggttta 1440

ttacagggac agcagagatc cagtttgggg atcaattgca tgaagaatct gcttagggtt 1500

aggcgttttg cgctgcttcg cgaggatctg cgatcgctcc ggtgcccgtc agtgggcaga 1560

gcgcacatcg cccacagtcc ccgagaagtt ggggggaggg gtcggcaatt gaaccggtgc 1620

ctagagaagg tggcgcgggg taaactggga aagtgatgtc gtgtactggc tccgcctttt 1680

tcccgagggt gggggagaac cgtatataag tgcagtagtc gccgtgaacg ttctttttcg 1740

caacgggttt gccgccagaa cacagctgaa gcttcgaggg gctcgcatct ctccttcacg 1800

cgcccgccgc cctacctgag gccgccatcc acgccggttg agtcgcgttc tgccgcctcc 1860

cgcctgtggt gcctcctgaa ctgcgtccgc cgtctaggta agtttaaagc tcaggtcgag 1920

accgggcctt tgtccggcgc tcccttggag cctacctaga ctcagccggc tctccacgct 1980

ttgcctgacc ctgcttgctc aactctacgt ctttgtttcg ttttctgttc tgcgccgtta 2040

cagatccaag ctgtgaccgg cgcctacggc tagcgaattc gccaccatgc tgctgctggt 2100

gacaagcctg ctgctgtgcg agctgcccca ccccgccttt ctgctgatcc cccagagcgt 2160

gaaagagtcc gagggcgacc tggtcacacc agccggcaac ctgaccctga cctgtaccgc 2220

cagcggcagc gacatcaacg actaccccat ctcttgggtc cgccaggctc ctggcaaggg 2280

actggaatgg atcggcttca tcaacagcgg cggcagcact tggtacgcca gctgggtcaa 2340

aggccggttc accatcagcc ggaccagcac caccgtggac ctgaagatga caagcctgac 2400

caccgacgac accgccacct acttttgcgc cagaggctac agcacctact acggcgactt 2460

caacatctgg ggccctggca ccctggtcac aatctctagc ggcggaggcg gcagcggagg 2520

tggaggaagt ggcggcggag gatccgagct ggtcatgacc cagaccccca gcagcacatc 2580

tggcgccgtg ggcggcaccg tgaccatcaa ttgccaggcc agccagagca tcgacagcaa 2640

cctggcctgg ttccagcaga agcccggcca gccccccacc ctgctgatct acagagcctc 2700

caacctggcc agcggcgtgc caagcagatt cagcggcagc agatctggca ccgagtacac 2760

cctgaccatc tccggcgtgc agagagagga cgccgctacc tattactgcc tgggcggcgt 2820

gggcaacgtg tcctacagaa ccagcttcgg cggaggtact gaggtggtcg tcaaatacgg 2880

accgccctgc ccccttgcc ctgcccccga gttcctgggc ggacccagcg tgttcctgtt 2940

ccccccaag cccaaggaca ccctgatgat cagccggacc cccgaggtga cctgcgtggt 3000

ggtggacgtg agccaggaag atcccgaggt ccagttcaat tggtacgtgg acggcgtgga 3060

agtgcacaac gccaagacca agcccagaga ggaacagttc aacagcacct accgggtggt 3120

gtctgtgctg accgtgctgc accaggactg gctgaacggc aaagaataca agtgcaaggt 3180

gtccaacaag ggcctgccca gcagcatcga aaagaccatc agcaaggcca agggccagcc 3240

tcgcgagccc caggtgtaca ccctgcctcc ctcccaggaa gagatgacca agaaccaggt 3300

gtccctgacc tgcctggtga agggcttcta ccccagcgac atcgccgtgg agtgggagag 3360

caacggccag cctgagaaca actacaagac cacccctccc gtgctggaca gcgacggcag 3420

cttcttcctg tacagccggc tgaccgtgga caagagccgg tggcaggaag gcaacgtctt 3480

tagctgcagc gtgatgcacg aggccctgca caaccactac acccagaaga gcctgagcct 3540

gtccctgggc aagatgttct gggtgctggt ggtggtgggc ggggtgctgg cctgctacag 3600

cctgctggtg acagtggcct tcatcatctt ttgggtgaaa cggggcagaa agaaactcct 3660

gtatatattc aaacaaccat ttatgagacc agtacaaact actcaagagg aagatggctg 3720

tagctgccga tttccagaag aagaagaagg aggatgtgaa ctgcgggtga agttcagcag 3780

aagcgccgac gcccctgcct accagcaggg ccagaatcag ctgtacaacg agctgaacct 3840

gggcagaagg gaagagtacg acgtcctgga taagcggaga ggccgggacc ctgagatggg 3900

cggcaagcct cggcggaaga acccccagga aggcctgtat aacgaactgc agaaagacaa 3960

gatggccgag gcctacagcg agatcggcat gaagggcgag cggaggcggg gcaagggcca 4020

cgacggcctg tatcagggcc tgtccaccgc caccaaggat acctacgacg ccctgcacat 4080

gcaggccctg cccccaaggc tcgagggcgg cggagagggc agaggaagtc ttctaacatg 4140

cggtgacgtg gaggagaatc ccggccctag gatgcttctc ctggtgacaa gccttctgct 4200

ctgtgagtta ccacacccag cattcctcct gatcccacgc aaagtgtgta acggaatagg 4260

tattggtgaa tttaaagact cactctccat aaatgctacg aatattaaac acttcaaaaa 4320

ctgcacctcc atcagtggcg atctccacat cctgccggtg gcatttaggg gtgactcctt 4380

cacacatact cctcctctgg atccacagga actggatatt ctgaaaaccg taaaggaaat 4440

cacagggttt ttgctgattc aggcttggcc tgaaaacagg acggacctcc atgcctttga 4500

gaacctagaa atcatacgcg gcaggaccaa gcaacatggt cagttttctc ttgcagtcgt 4560

cagcctgaac ataacatcct tgggattacg ctccctcaag gagataagtg atggagatgt 4620

gataatttca ggaaacaaaa atttgtgcta tgcaaataca ataaactgga aaaaactgtt 4680

tgggacctcc ggtcagaaaa ccaaaattat aagcaacaga ggtgaaaaca gctgcaaggc 4740

cacaggccag gtctgccatg ccttgtgctc ccccgagggc tgctggggcc cggagcccag 4800

ggactgcgtc tcttgccgga atgtcagccg aggcagggaa tgcgtggaca agtgcaacct 4860

tctggagggt gagccaaggg agtttgtgga gaactctgag tgcatacagt gccacccaga 4920

gtgcctgcct caggccatga acatcacctg cacaggacgg ggaccagaca actgtatcca 4980

gtgtgcccac tacattgacg gcccccactg cgtcaagacc tgcccggcag gagtcatggg 5040

agaaaacaac accctggtct ggaagtacgc agacgccggc catgtgtgcc acctgtgcca 5100

tccaaactgc acctacggat gcactgggcc aggtcttgaa ggctgtccaa cgaatgggcc 5160

taagatcccg tccatcgcca ctgggatggt gggggccctc ctcttgctgc tggtggtggc 5220

cctggggatc ggcctcttca tgtgagcggc cgctctagac ccgggctgca ggaattcgat 5280

atcaagctta tcgataatca acctctggat tacaaaattt gtgaaagatt gactggtatt 5340

cttaactatg ttgctccttt tacgctatgt ggatacgctg ctttaatgcc tttgtatcat 5400

gctattgctt cccgtatggc tttcattttc tcctccttgt ataaatcctg gttgctgtct 5460

ctttatgagg agttgtggcc cgttgtcagg caacgtggcg tggtgtgcac tgtgtttgct 5520

gacgcaaccc ccactggttg gggcattgcc accacctgtc agctcctttc cgggactttc 5580

gctttccccc tccctattgc cacggcggaa ctcatcgccg cctgccttgc ccgctgctgg 5640

acaggggctc ggctgttggg cactgacaat tccgtggtgt tgtcggggaa atcatcgtcc 5700

tttccttggc tgctcgcctg tgttgccacc tggattctgc gcgggacgtc cttctgctac 5760

gtcccttcgg ccctcaatcc agcggacctt ccttcccgcg gcctgctgcc ggctctgcgg 5820

cctcttccgc gtcttcgcct tcgccctcag acgagtcgga tctccctttg ggccgcctcc 5880

ccgcatcgat accgtcgact agccgtacct ttaagaccaa tgacttacaa ggcagctgta 5940

gatcttagcc acttttttaaa agaaaagggg ggactggaag ggctaattca ctcccaaaga 6000

agacaagatc tgctttttgc ctgtactggg tctctctggt tagaccagat ctgagcctgg 6060

gagctctctg gctaactagg gaacccactg cttaagcctc aataaagctt gccttgagtg 6120

cttcaagtag tgtgtgcccg tctgttgtgt gactctggta actagagatc cctcagaccc 6180

ttttagtcag tgtggaaaat ctctagcaga attcgatatc aagcttatcg ataccgtcga 6240

cctcgagggg gggcccggta cccaattcgc cctatagtga gtcgtattac aattcactgg 6300

ccgtcgtttt acaacgtcgt gactgggaaa accctggcgt tacccaactt aatcgccttg 6360

cagcacatcc ccctttcgcc agctggcgta atagcgaaga ggcccgcacc gatcgccctt 6420

cccaacagtt gcgcagcctg aatggcgaat ggaaattgta agcgttaata ttttgttaaa 6480

attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc atttttttaac caataggccg aaatcggcaa 6540

aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga gatagggttg agtgttgttc cagtttggaa 6600

caagagtcca ctattaaaga acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca 6660

gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc ctaatcaagt tttttggggt cgaggtgccg 6720

taaagcacta aatcggaacc ctaaagggag cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc 6780

ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc 6840

aagtgtagcg gtcacgctgc gcgtaaccac cacacccgcc gcgcttaatg cgccgctaca 6900

gggcgcgtca ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga acccctattt gtttatttttt 6960

ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata 7020

atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttccgt gtcgcccttа ttccctttttt 7080

tgcggcattt tgccttcctg tttttgctca cccagaaacg ctggtgaaag taaaagatgc 7140

tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta catcgaactg gatctcaaca gcggtaagat 7200

ccttgagagt tttcgccccg aagaacgttt tccaatgatg agcactttta aagttctgct 7260

atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag caactcggtc gccgcataca 7320

ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca gaaaagcatc ttacggatgg 7380

catgacagta agagaattat gcagtgctgc cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa 7440

cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc gctttttgc acaacatggg 7500

ggatcatgta actcgccttg atcgttggga accggagctg aatgaagcca taccaaacga 7560

cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg 7620

cgaactactt actctagctt cccggcaaca attaatagac tggatggagg cggataaagt 7680

tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc ggctggctgg tttattgctg ataaatctgg 7740

agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc 7800

ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca 7860

gatcgctgag ataggtgcct cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc 7920

atatatactt tagattgatt taaaacttca tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat 7980

ccttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc 8040

agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg 8100

ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcggtggtt tgtttgccgg atcaagagct 8160

accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgttct 8220

tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct 8280

cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg 8340

gttggactca agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggttc 8400

gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga 8460

gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg 8520

cagggtcgga acaggagagc gcacgaggga gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta 8580

tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg 8640

ggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg 8700

ctggcctttt gctcacatgt tctttcctgc gttatcccct gattctgtgg ataaccgtat 8760

taccgccttt gagtgagctg ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcgagtc 8820

agtgagcgag gaagcggaag agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc 8880

gattcattaa tgcagctggc acgacaggtt tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgcaa 8940

cgcaattaat gtgagttagc tcactcatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc 9000

ggctcgtatg ttgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga 9060

ccatgattac gccaagctcg aaattaaccc tcactaaagg gaacaaaagc tggagctcca 9120

ccgcggtggc ggcctcgagg tcgagatccg gtcgaccagc aaccatagtc ccgcccctaa 9180

ctccgcccat cccgccccta actccgccca gttccgccca ttctccgccc catggctgac 9240

taatttttt tatttatgca gaggccgagg ccgcctcggc ctctgagcta ttccagaagt 9300

agtgaggagg ctttttgga ggcctaggct tttgcaaaaa gcttcgacgg tatcgattgg 9360

ctcatgtcca acattaccgc catgttgaca ttgattattg actagttatt aatagtaatc 9420

aattacgggg tcattagttc atagcccata tatggagttc cgcgttacat aacttacggt 9480

aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga cccccgccca ttgacgtcaa taatgacgta 9540

tgttcccata gtaacgccaa tagggacttt ccattgacgt caatgggtgg agtatttacg 9600

gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg ccaagtacgc cccctattga 9660

cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca ttatgcccag tacatgacct tatgggactt 9720

tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt accatggtga tgcggttttg 9780

gcagtacatc aatgggcgtg gatagcggtt tgactcacgg ggatttccaa gtctccaccc 9840

cattgacgtc aatgggagtt tgttttggca ccaaaatcaa cgggactttc caaaatgtcg 9900

taacaactcc gccccattga cgcaaatggg cggtaggcgt gtacggaatt cggagtggcg 9960

agccctcaga tcctgcatat aagcagctgc tttttgcctg tactgggtct ctctg 10015

<210> 44
<211> 1055
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sintetica

<400> 44

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

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Gln Ser Val Lys Glu Ser Glu Gly Asp Leu
20 25 30

Val Thr Pro Ala Gly Asn Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Ser
35 40 45

Asp Ile Asn Asp Tyr Pro Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Phe Ile Asn Ser Gly Gly Ser Thr Trp Tyr
65 70 75 80

```
Ala Ser Trp Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr
                85                  90                  95

Val Asp Leu Lys Met Thr Ser Leu Thr Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr
            100                 105                 110

Phe Cys Ala Arg Gly Tyr Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp Phe Asn Ile Trp
        115                 120                 125

Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Leu Val Met Thr Gln Thr
145                 150                 155                 160

Pro Ser Ser Thr Ser Gly Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys
                165                 170                 175

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asp Ser Asn Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys
            180                 185                 190

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

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

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

Cys Leu Gly Gly Val Gly Asn Val Ser Tyr Arg Thr Ser Phe Gly Gly
                245                 250                 255

Gly Thr Glu Val Val Val Lys Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
            260                 265                 270

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
        275                 280                 285

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
    290                 295                 300

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
305                 310                 315                 320

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
                325                 330                 335
```

```
Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
            340                 345                 350

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
        355                 360                 365

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
    370                 375                 380

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
385                 390                 395                 400

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
                405                 410                 415

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
            420                 425                 430

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
        435                 440                 445

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
    450                 455                 460

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
465                 470                 475                 480

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Met Phe Trp Val
                485                 490                 495

Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr
            500                 505                 510

Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu
        515                 520                 525

Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu
    530                 535                 540

Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys
545                 550                 555                 560

Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln
                565                 570                 575

Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu
            580                 585                 590
```

```
Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly
        595                 600                 605

Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu
    610                 615                 620

Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly
625                 630                 635                 640

Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser
                645                 650                 655

Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro
            660                 665                 670

Pro Arg Leu Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys
        675                 680                 685

Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg Met Leu Leu Leu Val Thr
    690                 695                 700

Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro Ala Phe Leu Leu Ile Pro
705                 710                 715                 720

Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu
                725                 730                 735

Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile
            740                 745                 750

Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe
        755                 760                 765

Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr
    770                 775                 780

Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn
785                 790                 795                 800

Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg
                805                 810                 815

Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile
            820                 825                 830

Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val
```

835 840 845

Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp
850 855 860

Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn
865 870 875 880

Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu
885 890 895

Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser
900 905 910

Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu
915 920 925

Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln
930 935 940

Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly
945 950 955 960

Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro
965 970 975

His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr
980 985 990

Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His
995 1000 1005

Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys
1010 1015 1020

Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val
1025 1030 1035

Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu
1040 1045 1050

Phe Met
1055

<210> 45
<211> 10015
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sintetica

<400> 45
gttagaccag atctgagcct gggagctctc tggctaacta gggaacccac tgcttaagcc 60

tcaataaagc ttgccttgag tgcttcaagt agtgtgtgcc cgtctgttgt gtgactctgg 120

taactagaga tccctcagac ccttttagtc agtgtggaaa atctctagca gtggcgcccg 180

aacagggact tgaaagcgaa agggaaacca gaggagctct ctcgacgcag gactcggctt 240

gctgaagcgc gcacggcaag aggcgagggg cggcgactgg tgagtacgcc aaaaattttg 300

actagcggag gctagaagga gagagatggg tgcgagagcg tcagtattaa gcgggggaga 360

attagatcga tgggaaaaaa ttcggttaag gccaggggga aagaaaaaat ataaattaaa 420

acatatagta tgggcaagca gggagctaga acgattcgca gttaatcctg gcctgttaga 480

aacatcagaa ggctgtagac aaatactggg acagctacaa ccatcccttc agacaggatc 540

agaagaactt agatcattat ataatacagt agcaaccctc tattgtgtgc atcaaaggat 600

agagataaaa gacaccaagg aagctttaga caagatagag gaagagcaaa acaaaagtaa 660

gaaaaaagca cagcaagcag cagctgacac aggacacagc aatcaggtca gccaaaatta 720

ccctatagtg cagaacatcc aggggcaaat ggtacatcag gccatatcac ctagaacttt 780

aaatgcatgg gtaaaagtag tagaagagaa ggctttcagc ccagaagtga tacccatgtt 840

ttcagcatta tcagaaggag ccaccccaca agatttaaac accatgctaa acacagtggg 900

gggacatcaa gcagccatgc aaatgttaaa agagaccatc aatgaggaag ctgcaggcaa 960

agagaagagt ggtgcagaga gaaaaaagag cagtgggaat aggagctttg ttccttgggt 1020

tcttgggagc agcaggaagc actatgggcg cagcgtcaat gacgctgacg gtacaggcca 1080

gacaattatt gtctggtata gtgcagcagc agaacaattt gctgagggct attgaggcgc 1140

aacagcatct gttgcaactc acagtctggg gcatcaagca gctccaggca agaatcctgg 1200

ctgtggaaag atacctaaag gatcaacagc tcctggggat ttggggttgc tctggaaaac 1260

tcatttgcac cactgctgtg ccttggatct acaaatggca gtattcatcc acaattttaa 1320

aagaaaaggg gggattgggg ggtacagtgc aggggaaaga atagtagaca taatagcaac 1380

agacatacaa actaaagaat tacaaaaaca aattacaaaa attcaaaatt ttcgggttta 1440

ttacagggac agcagagatc cagtttgggg atcaattgca tgaagaatct gcttagggtt 1500

aggcgttttg cgctgcttcg cgaggatctg cgatcgctcc ggtgcccgtc agtgggcaga 1560

gcgcacatcg cccacagtcc ccgagaagtt gggggggaggg gtcggcaatt gaaccggtgc 1620

ctagagaagg tggcgcgggg taaactggga aagtgatgtc gtgtactggc tccgcctttt 1680

tcccgagggt gggggagaac cgtatataag tgcagtagtc gccgtgaacg ttctttttcg 1740

caacgggttt gccgccagaa cacagctgaa gcttcgaggg gctcgcatct ctccttcacg 1800

cgcccgccgc cctacctgag gccgccatcc acgccggttg agtcgcgttc tgccgcctcc 1860

cgcctgtggt gcctcctgaa ctgcgtccgc cgtctaggta agtttaaagc tcaggtcgag 1920

accgggcctt tgtccggcgc tcccttggag cctacctaga ctcagccggc tctccacgct 1980

ttgcctgacc ctgcttgctc aactctacgt ctttgtttcg ttttctgttc tgcgccgtta 2040

cagatccaag ctgtgaccgg cgcctacggc tagcgaattc gccaccatgc tgctgctggt 2100

gacaagcctg ctgctgtgcg agctgcccca ccccgccttt ctgctgatcc cccagagcgt 2160

gaaagagtcc gagggcgacc tggtcacacc agccggcaac ctgaccctga cctgtaccgc 2220

cagcggcagc gacatcaacg actaccccat ctcttgggtc cgccaggctc ctggcaaggg 2280

actggaatgg atcggcttca tcaacagcgg cggcagcact tggtacgcca gctgggtcaa 2340

aggccggttc accatcagcc ggaccagcac caccgtggac ctgaagatga caagcctgac 2400

caccgacgac accgccacct acttttgcgc cagaggctac agcacctact acggcgactt 2460

caacatctgg ggccctggca ccctggtcac aatctctagc ggcggaggcg gcagcggagg 2520

tggaggaagt ggcggcggag gatccgagct ggtcatgacc cagaccccca gcagcacatc 2580

tggcgccgtg ggcggcaccg tgaccatcaa ttgccaggcc agccagagca tcgacagcaa 2640

cctggcctgg ttccagcaga agcccggcca gccccccacc ctgctgatct acagagcctc 2700

caacctggcc agcggcgtgc caagcagatt cagcggcagc agatctggca ccgagtacac 2760

cctgaccatc tccggcgtgc agagagagga cgccgctacc tattactgcc tgggcggcgt 2820

gggcaacgtg tcctacagaa ccagcttcgg cggaggtact gaggtggtcg tcaaatacgg 2880

accgccctgc ccccttgcc ctgccccga gttcctgggc ggacccagcg tgttcctgtt 2940

ccccccaag cccaaggaca ccctgatgat cagccggacc cccgaggtga cctgcgtggt 3000

ggtggacgtg agccaggaag atcccgaggt ccagttcaat tggtacgtgg acggcgtgga 3060

agtgcacaac gccaagacca agcccagaga ggaacagttc aacagcacct accgggtggt 3120

gtctgtgctg accgtgctgc accaggactg gctgaacggc aaagaataca agtgcaaggt 3180

gtccaacaag ggcctgccca gcagcatcga aaagaccatc agcaaggcca agggccagcc 3240

tcgcgagccc caggtgtaca ccctgcctcc ctcccaggaa gagatgacca agaaccaggt 3300

gtccctgacc tgcctggtga agggcttcta ccccagcgac atcgccgtgg agtgggagag 3360

caacggccag cctgagaaca actacaagac cacccctccc gtgctggaca gcgacggcag 3420

cttcttcctg tacagccggc tgaccgtgga caagagccgg tggcaggaag gcaacgtctt 3480

tagctgcagc gtgatgcacg aggccctgca caaccactac acccagaaga gcctgagcct 3540

gtccctgggc aagatgttct gggtgctggt ggtggtgggc ggggtgctgg cctgctacag 3600

cctgctggtg acagtggcct tcatcatctt ttgggtgaaa cggggcagaa agaaactcct 3660

gtatatattc aaacaaccat ttatgagacc agtacaaact actcaagagg aagatggctg 3720

tagctgccga tttccagaag aagaagaagg aggatgtgaa ctgcgggtga agttcagcag 3780

aagcgccgac gcccctgcct accagcaggg ccagaatcag ctgtacaacg agctgaacct 3840

gggcagaagg gaagagtacg acgtcctgga taagcggaga ggccgggacc ctgagatggg 3900

cggcaagcct cggcggaaga acccccagga aggcctgtat aacgaactgc agaaagacaa 3960

gatggccgag gcctacagcg agatcggcat gaagggcgag cggaggcggg gcaagggcca 4020

cgacggcctg tatcagggcc tgtccaccgc caccaaggat acctacgacg ccctgcacat 4080

gcaggccctg cccccaaggc tcgagggcgg cggagagggc agaggaagtc ttctaacatg 4140

cggtgacgtg gaggagaatc ccggccctag gatgcttctc ctggtgacaa gccttctgct 4200

ctgtgagtta ccacacccag cattcctcct gatcccacgc aaagtgtgta acggaatagg 4260

tattggtgaa tttaaagact cactctccat aaatgctacg aatattaaac acttcaaaaa 4320

ctgcacctcc atcagtggcg atctccacat cctgccggtg gcatttaggg gtgactcctt 4380

cacacatact cctcctctgg atccacagga actggatatt ctgaaaaccg taaaggaaat 4440

cacagggttt ttgctgattc aggcttggcc tgaaaacagg acggacctcc atgcctttga 4500

gaacctagaa atcatacgcg gcaggaccaa gcaacatggt cagttttctc ttgcagtcgt 4560

cagcctgaac ataacatcct tgggattacg ctccctcaag gagataagtg atggagatgt 4620

gataatttca ggaaacaaaa atttgtgcta tgcaaataca ataaactgga aaaaactgtt 4680

tgggacctcc ggtcagaaaa ccaaaattat aagcaacaga ggtgaaaaca gctgcaaggc 4740

cacaggccag gtctgccatg ccttgtgctc ccccgagggc tgctggggcc cggagcccag 4800

ggactgcgtc tcttgccgga atgtcagccg aggcagggaa tgcgtggaca agtgcaacct 4860

tctggagggt gagccaaggg agtttgtgga gaactctgag tgcatacagt gccacccaga 4920

gtgcctgcct caggccatga acatcacctg cacaggacgg ggaccagaca actgtatcca 4980

gtgtgcccac tacattgacg gcccccactg cgtcaagacc tgcccggcag gagtcatggg 5040

agaaaacaac accctggtct ggaagtacgc agacgccggc catgtgtgcc acctgtgcca 5100

tccaaactgc acctacggat gcactgggcc aggtcttgaa ggctgtccaa cgaatgggcc 5160

taagatcccg tccatcgcca ctgggatggt gggggccctc ctcttgctgc tggtggtggc 5220

cctggggatc ggcctcttca tgtgagcggc cgctctagac ccgggctgca ggaattcgat 5280

atcaagctta tcgataatca acctctggat tacaaaattt gtgaaagatt gactggtatt 5340

cttaactatg ttgctccttt tacgctatgt ggatacgctg ctttaatgcc tttgtatcat 5400

gctattgctt cccgtatggc tttcattttc tcctccttgt ataaatcctg gttgctgtct 5460

ctttatgagg agttgtggcc cgttgtcagg caacgtggcg tggtgtgcac tgtgtttgct 5520

gacgcaaccc ccactggttg gggcattgcc accacctgtc agctcctttc cgggactttc 5580

gctttccccc tccctattgc cacggcggaa ctcatcgccg cctgccttgc ccgctgctgg 5640

acaggggctc ggctgttggg cactgacaat tccgtggtgt tgtcggggaa atcatcgtcc 5700

tttccttggc tgctcgcctg tgttgccacc tggattctgc gcgggacgtc cttctgctac 5760

gtcccttcgg ccctcaatcc agcggacctt ccttcccgcg gcctgctgcc ggctctgcgg 5820

cctcttccgc gtcttcgcct tcgccctcag acgagtcgga tctccctttg ggccgcctcc 5880

ccgcatcgat accgtcgact agccgtacct ttaagaccaa tgacttacaa ggcagctgta 5940

gatcttagcc acttttaaa agaaaagggg ggactggaag ggctaattca ctcccaaaga 6000

agacaagatc tgctttttgc ctgtactggg tctctctggt tagaccagat ctgagcctgg 6060

gagctctctg gctaactagg gaacccactg cttaagcctc aataaagctt gccttgagtg 6120

cttcaagtag tgtgtgcccg tctgttgtgt gactctggta actagagatc cctcagaccc 6180

ttttagtcag tgtggaaaat ctctagcaga attcgatatc aagcttatcg ataccgtcga 6240

cctcgagggg gggcccggta cccaattcgc cctatagtga gtcgtattac aattcactgg 6300

ccgtcgtttt acaacgtcgt gactgggaaa accctggcgt tacccaactt aatcgccttg 6360

cagcacatcc cctttcgcc agctggcgta atagcgaaga ggcccgcacc gatcgccctt 6420

cccaacagtt gcgcagcctg aatggcgaat ggaaattgta agcgttaata ttttgttaaa 6480

attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc atttttaac caataggccg aaatcggcaa 6540

aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga gatagggttg agtgttgttc cagtttggaa 6600

caagagtcca ctattaaaga acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca 6660

gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc ctaatcaagt tttttggggt cgaggtgccg 6720

taaagcacta aatcggaacc ctaaagggag cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc 6780

ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc 6840

aagtgtagcg gtcacgctgc gcgtaaccac cacacccgcc gcgcttaatg cgccgctaca 6900

gggcgcgtca ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga acccctattt gtttatttttt 6960

ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata 7020

atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttccgt gtcgccctta ttccctttttt 7080

tgcggcattt tgccttcctg tttttgctca cccagaaacg ctggtgaaag taaaagatgc 7140

tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta catcgaactg gatctcaaca gcggtaagat 7200

ccttgagagt tttcgccccg aagaacgttt tccaatgatg agcactttta aagttctgct 7260

atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag caactcggtc gccgcataca 7320

ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca gaaaagcatc ttacggatgg 7380

catgacagta agagaattat gcagtgctgc cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa 7440

cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc gctttttgc acaacatggg 7500

ggatcatgta actcgccttg atcgttggga accggagctg aatgaagcca taccaaacga 7560

cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg 7620

cgaactactt actctagctt cccggcaaca attaatagac tggatggagg cggataaagt 7680

tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc ggctggctgg tttattgctg ataaatctgg 7740

agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc 7800

ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca 7860

gatcgctgag ataggtgcct cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc 7920

atatatactt tagattgatt taaaacttca tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat 7980

ccttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc 8040

agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg 8100

ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcggtggtt tgtttgccgg atcaagagct 8160

accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgttct 8220

tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct 8280

cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg 8340

gttggactca agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggttc 8400

gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga 8460

gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg 8520

cagggtcgga acaggagagc gcacgaggga gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta 8580

tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg 8640

ggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg 8700

ctggcctttt gctcacatgt tctttcctgc gttatcccct gattctgtgg ataaccgtat 8760

taccgccttt gagtgagctg ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcgagtc 8820

agtgagcgag gaagcggaag agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc 8880

gattcattaa tgcagctggc acgacaggtt tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgcaa 8940

cgcaattaat gtgagttagc tcactcatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc 9000

ggctcgtatg ttgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga 9060

ccatgattac gccaagctcg aaattaaccc tcactaaagg gaacaaaagc tggagctcca 9120

ccgcggtggc ggcctcgagg tcgagatccg gtcgaccagc aaccatagtc ccgcccctaa 9180

ctccgcccat cccgccccta actccgccca gttccgccca ttctccgccc catggctgac 9240

taatttttt tatttatgca gaggccgagg ccgcctcggc ctctgagcta ttccagaagt 9300

agtgaggagg ctttttgga ggcctaggct tttgcaaaaa gcttcgacgg tatcgattgg 9360

ctcatgtcca acattaccgc catgttgaca ttgattattg actagttatt aatagtaatc 9420

aattacgggg tcattagttc atagcccata tatggagttc cgcgttacat aacttacggt 9480

aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga cccccgccca ttgacgtcaa taatgacgta 9540

tgttcccata gtaacgccaa tagggacttt ccattgacgt caatgggtgg agtatttacg 9600

gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg ccaagtacgc cccctattga 9660

cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca ttatgcccag tacatgacct tatgggactt 9720

tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt accatggtga tgcggttttg 9780

gcagtacatc aatgggcgtg gatagcggtt tgactcacgg ggatttccaa gtctccaccc 9840

cattgacgtc aatgggagtt tgttttggca ccaaaatcaa cgggactttc caaaatgtcg 9900

taacaactcc gccccattga cgcaaatggg cggtaggcgt gtacggaatt cggagtggcg 9960

agccctcaga tcctgcatat aagcagctgc tttttgcctg tactgggtct ctctg 10015

<210> 46
<211> 945
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sintetica

<400> 46

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

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Gln Ser Val Lys Glu Ser Glu Gly Asp Leu
20 25 30

Val Thr Pro Ala Gly Asn Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Ser
35 40 45

Asp Ile Asn Asp Tyr Pro Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Phe Ile Asn Ser Gly Gly Ser Thr Trp Tyr
65 70 75 80

Ala Ser Trp Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr
85 90 95

Val Asp Leu Lys Met Thr Ser Leu Thr Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr
100 105 110

```
Phe Cys Ala Arg Gly Tyr Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp Phe Asn Ile Trp
        115                 120                 125

Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Leu Val Met Thr Gln Thr
145                 150                 155                 160

Pro Ser Ser Thr Ser Gly Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys
                165                 170                 175

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asp Ser Asn Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys
            180                 185                 190

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

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

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

Cys Leu Gly Gly Val Gly Asn Val Ser Tyr Arg Thr Ser Phe Gly Gly
                245                 250                 255

Gly Thr Glu Val Val Val Lys Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
            260                 265                 270

Pro Cys Pro Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
        275                 280                 285

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
    290                 295                 300

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
305                 310                 315                 320

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
                325                 330                 335

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
            340                 345                 350

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
        355                 360                 365
```

```
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Met Phe
    370                 375                 380

Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu
385                 390                 395                 400

Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys
                405                 410                 415

Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr
            420                 425                 430

Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly
        435                 440                 445

Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala
    450                 455                 460

Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg
465                 470                 475                 480

Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu
                485                 490                 495

Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn
            500                 505                 510

Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
        515                 520                 525

Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
    530                 535                 540

Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala
545                 550                 555                 560

Leu Pro Pro Arg Leu Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu
                565                 570                 575

Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg Met Leu Leu Leu
            580                 585                 590

Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro Ala Phe Leu Leu
        595                 600                 605

Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp
    610                 615                 620
```

```
Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr
625                 630                 635                 640

Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp
                645                 650                 655

Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu
            660                 665                 670

Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro
        675                 680                 685

Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg
    690                 695                 700

Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu
705                 710                 715                 720

Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly
                725                 730                 735

Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile
            740                 745                 750

Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile
        755                 760                 765

Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His
    770                 775                 780

Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys
785                 790                 795                 800

Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys
                805                 810                 815

Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys
            820                 825                 830

Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys
        835                 840                 845

Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp
    850                 855                 860

Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn
```

865 870 875 880

Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu
885 890 895

Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly
900 905 910

Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val
915 920 925

Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe
930 935 940

Met
945

<210> 47
<211> 9685
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sintetica

<400> 47
gttagaccag atctgagcct gggagctctc tggctaacta gggaacccac tgcttaagcc 60

tcaataaagc ttgccttgag tgcttcaagt agtgtgtgcc cgtctgttgt gtgactctgg 120

taactagaga tccctcagac cttttagtc agtgtggaaa atctctagca gtggcgcccg 180

aacagggact tgaaagcgaa agggaaacca gaggagctct ctcgacgcag gactcggctt 240

gctgaagcgc gcacggcaag aggcgagggg cggcgactgg tgagtacgcc aaaaattttg 300

actagcggag gctagaagga gagagatggg tgcgagagcg tcagtattaa gcgggggaga 360

attagatcga tgggaaaaaa ttcggttaag gccaggggga aagaaaaaat ataaattaaa 420

acatatagta tgggcaagca gggagctaga acgattcgca gttaatcctg gcctgttaga 480

aacatcagaa ggctgtagac aaatactggg acagctacaa ccatcccttc agacaggatc 540

agaagaactt agatcattat ataatacagt agcaaccctc tattgtgtgc atcaaaggat 600

agagataaaa gacaccaagg aagctttaga caagatagag gaagagcaaa acaaaagtaa 660

gaaaaaagca cagcaagcag cagctgacac aggacacagc aatcaggtca gccaaaatta 720

ccctatagtg cagaacatcc aggggcaaat ggtacatcag gccatatcac ctagaacttt 780

aaatgcatgg gtaaaagtag tagaagagaa ggctttcagc ccagaagtga tacccatgtt 840

ttcagcatta tcagaaggag ccaccccaca agatttaaac accatgctaa acacagtggg 900

gggacatcaa gcagccatgc aaatgttaaa agagaccatc aatgaggaag ctgcaggcaa 960

agagaagagt ggtgcagaga gaaaaaagag cagtgggaat aggagctttg ttccttgggt 1020

tcttgggagc agcaggaagc actatgggcg cagcgtcaat gacgctgacg gtacaggcca 1080

gacaattatt gtctggtata gtgcagcagc agaacaattt gctgagggct attgaggcgc 1140

aacagcatct gttgcaactc acagtctggg gcatcaagca gctccaggca agaatcctgg 1200

ctgtggaaag atacctaaag gatcaacagc tcctggggat ttggggttgc tctggaaaac 1260

tcatttgcac cactgctgtg ccttggatct acaaatggca gtattcatcc acaattttaa 1320

aagaaaaggg gggattgggg ggtacagtgc aggggaaaga atagtagaca taatagcaac 1380

agacatacaa actaaagaat tacaaaaaca aattacaaaa attcaaaatt ttcgggttta 1440

ttacagggac agcagagatc cagtttgggg atcaattgca tgaagaatct gcttagggtt 1500

aggcgttttg cgctgcttcg cgaggatctg cgatcgctcc ggtgcccgtc agtgggcaga 1560

gcgcacatcg cccacagtcc ccgagaagtt ggggggaggg gtcggcaatt gaaccggtgc 1620

ctagagaagg tggcgcgggg taaactggga aagtgatgtc gtgtactggc tccgcctttt 1680

tcccgagggt gggggagaac cgtatataag tgcagtagtc gccgtgaacg ttctttttcg 1740

caacgggttt gccgccagaa cacagctgaa gcttcgaggg gctcgcatct ctccttcacg 1800

cgcccgccgc cctacctgag gccgccatcc acgccggttg agtcgcgttc tgccgcctcc 1860

cgcctgtggt gcctcctgaa ctgcgtccgc cgtctaggta agtttaaagc tcaggtcgag 1920

accgggcctt tgtccggcgc tcccttggag cctacctaga ctcagccggc tctccacgct 1980

ttgcctgacc ctgcttgctc aactctacgt ctttgtttcg ttttctgttc tgcgccgtta 2040

cagatccaag ctgtgaccgg cgcctacggc tagcgaattc gccaccatgc tgctgctggt 2100

gacaagcctg ctgctgtgcg agctgcccca ccccgccttt ctgctgatcc cccagagcgt 2160

gaaagagtcc gagggcgacc tggtcacacc agccggcaac ctgaccctga cctgtaccgc 2220

cagcggcagc gacatcaacg actaccccat ctcttgggtc cgccaggctc ctggcaaggg 2280

actggaatgg atcggcttca tcaacagcgg cggcagcact tggtacgcca gctgggtcaa 2340

aggccggttc accatcagcc ggaccagcac caccgtggac ctgaagatga caagcctgac 2400

caccgacgac accgccacct acttttgcgc cagaggctac agcacctact acggcgactt 2460

caacatctgg ggccctggca ccctggtcac aatctctagc ggcggaggcg gcagcggagg 2520

tggaggaagt ggcggcggag gatccgagct ggtcatgacc cagaccccca gcagcacatc 2580

tggcgccgtg ggcggcaccg tgaccatcaa ttgccaggcc agccagagca tcgacagcaa 2640

cctggcctgg ttccagcaga agcccggcca gccccccacc ctgctgatct acagagcctc 2700

caacctggcc agcggcgtgc caagcagatt cagcggcagc agatctggca ccgagtacac 2760

cctgaccatc tccggcgtgc agagagagga cgccgctacc tattactgcc tgggcggcgt 2820

gggcaacgtg tcctacagaa ccagcttcgg cggaggtact gaggtggtcg tcaaatacgg 2880

accgccctgc ccccttgcc ctggccagcc tcgcgagccc caggtgtaca ccctgcctcc 2940

ctcccaggaa gagatgacca agaaccaggt gtccctgacc tgcctggtga agggcttcta 3000

ccccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cctgagaaca actacaagac 3060

caccctccc gtgctggaca gcgacggcag cttcttcctg tacagccggc tgaccgtgga 3120

caagagccgg tggcaggaag gcaacgtctt tagctgcagc gtgatgcacg aggccctgca 3180

caaccactac acccagaaga gcctgagcct gtccctgggc aagatgttct gggtgctggt 3240

ggtggtgggc ggggtgctgg cctgctacag cctgctggtg acagtggcct tcatcatctt 3300

ttgggtgaaa cggggcagaa agaaactcct gtatatattc aaacaaccat ttatgagacc 3360

agtacaaact actcaagagg aagatggctg tagctgccga tttccagaag aagaagaagg 3420

aggatgtgaa ctgcgggtga agttcagcag aagcgccgac gcccctgcct accagcaggg 3480

ccagaatcag ctgtacaacg agctgaacct gggcagaagg gaagagtacg acgtcctgga 3540

taagcggaga ggccgggacc ctgagatggg cggcaagcct cggcggaaga acccccagga 3600

aggcctgtat aacgaactgc agaaagacaa gatggccgag gcctacagcg agatcggcat 3660

gaagggcgag cggaggcggg gcaagggcca cgacggcctg tatcagggcc tgtccaccgc 3720

caccaaggat acctacgacg ccctgcacat gcaggccctg cccccaaggc tcgagggcgg 3780

cggagagggc agaggaagtc ttctaacatg cggtgacgtg gaggagaatc ccggccctag 3840

gatgcttctc ctggtgacaa gccttctgct ctgtgagtta ccacacccag cattcctcct 3900

gatcccacgc aaagtgtgta acggaatagg tattggtgaa tttaaagact cactctccat 3960

aaatgctacg aatattaaac acttcaaaaa ctgcacctcc atcagtggcg atctccacat 4020

cctgccggtg gcatttaggg gtgactcctt cacacatact cctcctctgg atccacagga 4080

actggatatt ctgaaaaccg taaaggaaat cacagggttt ttgctgattc aggcttggcc 4140

tgaaaacagg acggacctcc atgcctttga gaacctagaa atcatacgcg gcaggaccaa 4200

gcaacatggt cagttttctc ttgcagtcgt cagcctgaac ataacatcct tgggattacg 4260

ctccctcaag gagataagtg atggagatgt gataatttca ggaaacaaaa atttgtgcta 4320

tgcaaataca ataaactgga aaaaactgtt tgggacctcc ggtcagaaaa ccaaaattat 4380

aagcaacaga ggtgaaaaca gctgcaaggc cacaggccag gtctgccatg ccttgtgctc 4440

ccccgagggc tgctggggcc cggagcccag ggactgcgtc tcttgccgga atgtcagccg 4500

aggcagggaa tgcgtggaca agtgcaacct tctggagggt gagccaaggg agtttgtgga 4560

gaactctgag tgcatacagt gccacccaga gtgcctgcct caggccatga acatcacctg 4620

cacaggacgg ggaccagaca actgtatcca gtgtgcccac tacattgacg gcccccactg 4680

cgtcaagacc tgcccggcag gagtcatggg agaaaacaac accctggtct ggaagtacgc 4740

agacgccggc catgtgtgcc acctgtgcca tccaaactgc acctacggat gcactgggcc 4800

aggtcttgaa ggctgtccaa cgaatgggcc taagatcccg tccatcgcca ctgggatggt 4860

gggggccctc ctcttgctgc tggtggtggc cctggggatc ggcctcttca tgtgagcggc 4920

cgctctagac ccgggctgca ggaattcgat atcaagctta tcgataatca acctctggat 4980

tacaaaattt gtgaaagatt gactggtatt cttaactatg ttgctccttt tacgctatgt 5040

ggatacgctg ctttaatgcc tttgtatcat gctattgctt cccgtatggc tttcattttc 5100

tcctccttgt ataaatcctg gttgctgtct ctttatgagg agttgtggcc cgttgtcagg 5160

caacgtggcg tggtgtgcac tgtgtttgct gacgcaaccc ccactggttg gggcattgcc 5220

accacctgtc agctcctttc cgggactttc gctttccccc tccctattgc cacggcggaa 5280

ctcatcgccg cctgccttgc ccgctgctgg acaggggctc ggctgttggg cactgacaat 5340

tccgtggtgt tgtcggggaa atcatcgtcc tttccttggc tgctcgcctg tgttgccacc 5400

tggattctgc gcgggacgtc cttctgctac gtcccttcgg ccctcaatcc agcggacctt 5460

ccttcccgcg gcctgctgcc ggctctgcgg cctcttccgc gtcttcgcct tcgccctcag 5520

acgagtcgga tctccctttg ggccgcctcc ccgcatcgat accgtcgact agccgtacct 5580

ttaagaccaa tgacttacaa ggcagctgta gatcttagcc acttttaaa agaaaagggg 5640

ggactggaag ggctaattca ctcccaaaga agacaagatc tgcttttgc ctgtactggg 5700

tctctctggt tagaccagat ctgagcctgg gagctctctg gctaactagg gaacccactg 5760

cttaagcctc aataaagctt gccttgagtg cttcaagtag tgtgtgcccg tctgttgtgt 5820

gactctggta actagagatc cctcagaccc ttttagtcag tgtggaaaat ctctagcaga 5880

attcgatatc aagcttatcg ataccgtcga cctcgagggg gggcccggta cccaattcgc 5940

cctatagtga gtcgtattac aattcactgg ccgtcgtttt acaacgtcgt gactgggaaa 6000

accctggcgt tacccaactt aatcgccttg cagcacatcc cctttcgcc agctggcgta 6060

atagcgaaga ggcccgcacc gatcgccctt cccaacagtt gcgcagcctg aatggcgaat 6120

ggaaattgta agcgttaata ttttgttaaa attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc 6180

atttttaac caataggccg aaatcggcaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga 6240

gatagggttg agtgttgttc cagtttggaa caagagtcca ctattaaaga acgtggactc 6300

caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc 6360

ctaatcaagt tttttggggt cgaggtgccg taaagcacta aatcggaacc ctaaagggag 6420

cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa 6480

agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgctgc gcgtaaccac 6540

cacacccgcc gcgcttaatg cgccgctaca gggcgcgtca ggtggcactt ttcggggaaa 6600

tgtgcgcgga acccctattt gtttattttt ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat 6660

gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta tgagtattca 6720

acatttccgt gtcgccctta ttccctttt tgcggcattt tgccttcctg tttttgctca 6780

cccagaaacg ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta 6840

catcgaactg gatctcaaca gcggtaagat ccttgagagt tttcgccccg aagaacgttt 6900

tccaatgatg agcactttta aagttctgct atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc 6960

cgggcaagag caactcggtc gccgcataca ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc 7020

accagtcaca gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta agagaattat gcagtgctgc 7080

cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa 7140

ggagctaacc gcttttttgc acaacatggg ggatcatgta actcgccttg atcgttggga 7200

accggagctg aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat 7260

ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt actctagctt cccggcaaca 7320

attaatagac tggatggagg cggataaagt tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc 7380

ggctggctgg tttattgctg ataaatctgg agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat 7440

tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag 7500

tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca gatcgctgag ataggtgcct cactgattaa 7560

gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc atatatactt tagattgatt taaaacttca 7620

tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat ccttttttgat aatctcatga ccaaaatccc 7680

ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc 7740

ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc 7800

agcggtggtt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt 7860

cagcagagcg cagataccaa atactgttct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt 7920

caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc 7980

tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa 8040

ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggggttc gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac 8100

ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg 8160

gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcgga acaggagagc gcacgaggga 8220

gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact 8280

tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa 8340

cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt gctcacatgt tctttcctgc 8400

gttatcccct gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt gagtgagctg ataccgctcg 8460

ccgcagccga acgaccgagc gcagcgagtc agtgagcgag gaagcggaag agcgcccaat 8520

acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa tgcagctggc acgacaggtt 8580

tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat gtgagttagc tcactcatta 8640

ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg ttgtgtggaa ttgtgagcgg 8700

ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac gccaagctcg aaattaaccc 8760

tcactaaagg gaacaaaagc tggagctcca ccgcggtggc ggcctcgagg tcgagatccg 8820

gtcgaccagc aaccatagtc ccgcccctaa ctccgcccat cccgccccta actccgccca 8880

gttccgccca ttctccgccc catggctgac taatttttt tatttatgca gaggccgagg 8940

ccgcctcggc ctctgagcta ttccagaagt agtgaggagg ctttttgga ggcctaggct 9000

tttgcaaaaa gcttcgacgg tatcgattgg ctcatgtcca acattaccgc catgttgaca 9060

ttgattattg actagttatt aatagtaatc aattacgggg tcattagttc atagcccata 9120

tatggagttc cgcgttacat aacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga 9180

cccccgccca ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgccaa tagggacttt 9240

ccattgacgt caatgggtgg agtatttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt 9300

gtatcatatg ccaagtacgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca 9360

ttatgcccag tacatgacct tatgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt 9420

catcgctatt accatggtga tgcggttttg gcagtacatc aatgggcgtg gatagcggtt 9480

tgactcacgg ggatttccaa gtctccaccc cattgacgtc aatgggagtt tgttttggca 9540

ccaaaatcaa cgggactttc caaaatgtcg taacaactcc gccccattga cgcaaatggg 9600

cggtaggcgt gtacggaatt cggagtggcg agccctcaga tcctgcatat aagcagctgc 9660

tttttgcctg tactgggtct ctctg 9685

<210> 48
<211> 838
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sintetica

<400> 48

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

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Gln Ser Val Lys Glu Ser Glu Gly Asp Leu
20 25 30

Val Thr Pro Ala Gly Asn Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Ser
35 40 45

```
Asp Ile Asn Asp Tyr Pro Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
    50                  55                  60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Phe Ile Asn Ser Gly Gly Ser Thr Trp Tyr
65                  70                  75                  80

Ala Ser Trp Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr
                85                  90                  95

Val Asp Leu Lys Met Thr Ser Leu Thr Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr
            100                 105                 110

Phe Cys Ala Arg Gly Tyr Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp Phe Asn Ile Trp
        115                 120                 125

Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Leu Val Met Thr Gln Thr
145                 150                 155                 160

Pro Ser Ser Thr Ser Gly Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys
                165                 170                 175

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asp Ser Asn Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys
            180                 185                 190

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

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

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

Cys Leu Gly Gly Val Gly Asn Val Ser Tyr Arg Thr Ser Phe Gly Gly
                245                 250                 255

Gly Thr Glu Val Val Val Lys Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
            260                 265                 270

Pro Cys Pro Met Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala
        275                 280                 285

Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys
    290                 295                 300
```

```
Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg
305                 310                 315                 320

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

Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser
            340                 345                 350

Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu
        355                 360                 365

Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg
    370                 375                 380

Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln
385                 390                 395                 400

Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr
                405                 410                 415

Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp
            420                 425                 430

Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala
        435                 440                 445

Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Leu Glu Gly Gly Gly Glu Gly
    450                 455                 460

Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro
465                 470                 475                 480

Arg Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His
                485                 490                 495

Pro Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile
            500                 505                 510

Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His
        515                 520                 525

Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val
    530                 535                 540

Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln
```

```
545                 550                 555                 560

Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu
                565                 570                 575

Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn
            580                 585                 590

Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu
        595                 600                 605

Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys
    610                 615                 620

Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys
625                 630                 635                 640

Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln
                645                 650                 655

Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr
            660                 665                 670

Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro
        675                 680                 685

Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu
    690                 695                 700

Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val
705                 710                 715                 720

Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala
                725                 730                 735

Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys
            740                 745                 750

Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly
        755                 760                 765

Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly
    770                 775                 780

His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly
785                 790                 795                 800
```

Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile
805 810 815

Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu
820 825 830

Gly Ile Gly Leu Phe Met
835

<210> 49
<211> 119
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sintetica

<400> 49

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Gly Gln Pro Arg
1 5 10 15

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
20 25 30

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
35 40 45

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
50 55 60

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
65 70 75 80

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
85 90 95

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
115

<210> 50
<211> 229
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sintetica

<400> 50

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
1 5 10 15

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
20 25 30

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

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
100 105 110

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
115 120 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
130 135 140

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
145 150 155 160

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

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
210 215 220

Leu Ser Leu Gly Lys
225

<210> 51
<211> 9

<212> PRT
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sintetica

<400> 51

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
1 5

<210> 52
<211> 10
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sintetica

<400> 52

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 53
<211> 14
<212> PRT
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sintetica

<400> 53

Glu Val Val Val Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 54
<211> 2529
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sintetica

<400> 54
atgcttctcc tggtgacaag ccttctgctc tgtgagttac cacacccagc attcctcctg 60

atcccagata tccagatgac ccagtccccg agctccctgt ccgcctctgt gggcgatagg 120

gtcaccatca cctgccgtgc cagtcaggat gtgaatactg ctgtagcctg gtatcaacag 180

aaaccaggaa aagctccgaa actactgatt tactcggcat ccttcctcta ctctggagtc 240

ccttctcgct tctctggttc cagatctggg acggatttca ctctgaccat cagcagtctg 300

cagccggaag acttcgcaac ttattactgt cagcaacatt atactactcc tcccacgttc 360

ggacagggta ccaaggtgga gatcaaaggc agtactagcg gcggtggctc cgggggcgga 420

tccggtgggg gcggcagcag cgaggttcag ctggtggagt ctggcggtgg cctggtgcag 480

ccaggggget cactccgttt gtcctgtgca gcttctggct tcaacattaa agacacctat 540

atacactggg tgcgtcaggc cccgggtaag ggcctggaat gggttgcaag gatttatcct 600

acgaatggtt atactagata tgccgatagc gtcaagggcc gtttcactat aagcgcagac 660

acatccaaaa acacagccta cctgcagatg aacagcctgc gtgctgagga cactgccgtc 720

tattattgtt ctagatgggg aggggacggc ttctatgcta tggactactg gggtcaagga 780

accctggtca ccgtctcgag tgagagcaag tacggaccgc cctgcccccc ttgccctatg 840

ttctgggtgc tggtggtggt cggaggcgtg ctggcctgct acagcctgct ggtcaccgtg 900

gccttcatca tcttttgggt gaaacggggc agaaagaaac tcctgtatat attcaaacaa 960

ccatttatga gaccagtaca aactactcaa gaggaagatg gctgtagctg ccgatttcca 1020

gaagaagaag aaggaggatg tgaactgcgg gtgaagttca gcagaagcgc cgacgcccct 1080

gcctaccagc agggccagaa tcagctgtac aacgagctga acctgggcag aagggaagag 1140

tacgacgtcc tggataagcg gagaggccgg gaccctgaga tgggcggcaa gcctcggcgg 1200

aagaaccccc aggaaggcct gtataacgaa ctgcagaaag acaagatggc cgaggcctac 1260

agcgagatcg gcatgaaggg cgagcggagg cggggcaagg gccacgacgg cctgtatcag 1320

ggcctgtcca ccgccaccaa ggatacctac gacgccctgc acatgcaggc cctgccccca 1380

aggctcgagg gcggcggaga gggcagagga agtcttctaa catgcggtga cgtggaggag 1440

aatcccggcc ctaggatgct tctcctggtg acaagccttc tgctctgtga gttaccacac 1500

ccagcattcc tcctgatccc acgcaaagtg tgtaacggaa taggtattgg tgaatttaaa 1560

gactcactct ccataaatgc tacgaatatt aaacacttca aaaactgcac ctccatcagt 1620

ggcgatctcc acatcctgcc ggtggcattt aggggtgact ccttcacaca tactcctcct 1680

ctggatccac aggaactgga tattctgaaa accgtaaagg aaatcacagg gtttttgctg 1740

attcaggctt ggcctgaaaa caggacggac ctccatgcct ttgagaacct agaaatcata 1800

cgcggcagga ccaagcaaca tggtcagttt tctcttgcag tcgtcagcct gaacataaca 1860

tccttgggat tacgctccct caaggagata agtgatggag atgtgataat ttcaggaaac 1920

aaaaatttgt gctatgcaaa tacaataaac tggaaaaaac tgtttgggac ctccggtcag 1980

aaaaccaaaa ttataagcaa cagaggtgaa aacagctgca aggccacagg ccaggtctgc 2040

catgccttgt gctcccccga gggctgctgg ggcccggagc ccagggactg cgtctcttgc 2100

cggaatgtca gccgaggcag ggaatgcgtg gacaagtgca accttctgga gggtgagcca 2160

agggagtttg tggagaactc tgagtgcata cagtgccacc cagagtgcct gcctcaggcc 2220

atgaacatca cctgcacagg acggggacca gacaactgta tccagtgtgc ccactacatt 2280

gacggccccc actgcgtcaa gacctgcccg gcaggagtca tgggagaaaa caacaccctg 2340

gtctggaagt acgcagacgc cggccatgtg tgccacctgt gccatccaaa ctgcacctac 2400

ggatgcactg ggccaggtct tgaaggctgt ccaacgaatg ggcctaagat cccgtccatc 2460

gccactggga tggtgggggc cctcctcttg ctgctggtgg tggccctggg gatcggcctc 2520

ttcatgtga 2529

<210> 55
<211> 2850
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sintetica

<400> 55
atgcttctcc tggtgacaag ccttctgctc tgtgagttac cacacccagc attcctcctg 60

atcccagata tccagatgac ccagtccccg agctccctgt ccgcctctgt gggcgatagg 120

gtcaccatca cctgccgtgc cagtcaggat gtgaatactg ctgtagcctg gtatcaacag 180

aaaccaggaa aagctccgaa actactgatt tactcggcat ccttcctcta ctctggagtc 240

ccttctcgct tctctggttc cagatctggg acggatttca ctctgaccat cagcagtctg 300

cagccggaag acttcgcaac ttattactgt cagcaacatt atactactcc tcccacgttc 360

ggacagggta ccaaggtgga gatcaaaggc agtactagcg gcggtggctc cgggggcgga 420

tccggtgggg gcggcagcag cgaggttcag ctggtggagt ctggcggtgg cctggtgcag 480

ccaggggggct cactccgttt gtcctgtgca gcttctggct tcaacattaa agacacctat 540

atacactggg tgcgtcaggc cccgggtaag ggcctggaat gggttgcaag gatttatcct 600

acgaatggtt atactagata tgccgatagc gtcaagggcc gtttcactat aagcgcagac 660

acatccaaaa acacagccta cctgcagatg aacagcctgc gtgctgagga cactgccgtc 720

tattattgtt ctagatgggg aggggacggc ttctatgcta tggactactg gggtcaagga 780

accctggtca ccgtctcgag tgagagcaag tacggaccgc cctgcccccc ttgccctggc 840

cagcctagag aaccccaggt gtacaccctg cctcccagcc aggaagagat gaccaagaac 900

caggtgtccc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctacccca gcgatatcgc cgtggaatgg 960

gagagcaacg gccagcccga gaacaactac aagaccaccc cccctgtgct ggacagcgac 1020

ggcagcttct tcctgtactc ccggctgacc gtggacaaga gccggtggca ggaaggcaac 1080

gtcttcagct gcagcgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacaccca gaagtccctg 1140

agcctgagcc tgggcaagat gttctgggtg ctggtggtgg tcggaggcgt gctggcctgc 1200

tacagcctgc tggtcaccgt ggccttcatc atcttttggg tgaaacgggg cagaaagaaa 1260

ctcctgtata tattcaaaca accatttatg agaccagtac aaactactca agaggaagat 1320

ggctgtagct gccgatttcc agaagaagaa gaaggaggat gtgaactgcg ggtgaagttc 1380

agcagaagcg ccgacgcccc tgcctaccag cagggccaga atcagctgta caacgagctg 1440

aacctgggca gaagggaaga gtacgacgtc ctggataagc ggagaggccg ggaccctgag 1500

atgggcggca agcctcggcg gaagaacccc caggaaggcc tgtataacga actgcagaaa 1560

gacaagatgg ccgaggccta cagcgagatc ggcatgaagg gcgagcggag gcggggcaag 1620

ggccacgacg gcctgtatca gggcctgtcc accgccacca aggataccta cgacgccctg 1680

cacatgcagg ccctgccccc aaggctcgag ggcggcggag agggcagagg aagtcttcta 1740

acatgcggtg acgtggagga gaatcccggc cctaggatgc ttctcctggt gacaagcctt 1800

ctgctctgtg agttaccaca cccagcattc ctcctgatcc cacgcaaagt gtgtaacgga 1860

ataggtattg gtgaatttaa agactcactc tccataaatg ctacgaatat taaacacttc 1920

aaaaactgca cctccatcag tggcgatctc cacatcctgc cggtggcatt taggggtgac 1980

tccttcacac atactcctcc tctggatcca caggaactgg atattctgaa aaccgtaaag 2040

gaaatcacag ggtttttgct gattcaggct tggcctgaaa acaggacgga cctccatgcc 2100

tttgagaacc tagaaatcat acgcggcagg accaagcaac atggtcagtt ttctcttgca 2160

gtcgtcagcc tgaacataac atccttggga ttacgctccc tcaaggagat aagtgatgga 2220

gatgtgataa tttcaggaaa caaaaatttg tgctatgcaa atacaataaa ctggaaaaaa 2280

ctgtttggga cctccggtca gaaaaccaaa attataagca acagaggtga aaacagctgc 2340

aaggccacag gccaggtctg ccatgccttg tgctcccccg agggctgctg gggcccggag 2400

cccagggact gcgtctcttg ccggaatgtc agccgaggca gggaatgcgt ggacaagtgc 2460

aaccttctgg agggtgagcc aagggagttt gtggagaact ctgagtgcat acagtgccac 2520

ccagagtgcc tgcctcaggc catgaacatc acctgcacag gacggggacc agacaactgt 2580

atccagtgtg cccactacat tgacggcccc cactgcgtca agacctgccc ggcaggagtc 2640

atgggagaaa acaacaccct ggtctggaag tacgcagacg ccggccatgt gtgccacctg 2700

tgccatccaa actgcaccta cggatgcact gggccaggtc ttgaaggctg tccaacgaat 2760

gggcctaaga tcccgtccat cgccactggg atggtggggg ccctcctctt gctgctggtg 2820

gtggccctgg ggatcggcct cttcatgtga 2850

<210> 56
<211> 3180
<212> DNA
<213> Sequenza artificiale

<220>
<223> Sintetica

<400> 56
atgcttctcc tggtgacaag ccttctgctc tgtgagttac cacacccagc attcctcctg 60

atcccagata tccagatgac ccagtccccg agctccctgt ccgcctctgt gggcgatagg 120

gtcaccatca cctgccgtgc cagtcaggat gtgaatactg ctgtagcctg gtatcaacag 180

aaaccaggaa aagctccgaa actactgatt tactcggcat ccttcctcta ctctggagtc 240

ccttctcgct tctctggttc cagatctggg acggatttca ctctgaccat cagcagtctg 300

cagccggaag acttcgcaac ttattactgt cagcaacatt atactactcc tcccacgttc 360

ggacagggta ccaaggtgga gatcaaaggc agtactagcg gcggtggctc cgggggcgga 420

tccggtgggg gcggcagcag cgaggttcag ctggtggagt ctggcggtgg cctggtgcag 480

ccaggggget cactccgttt gtcctgtgca gcttctggct tcaacattaa agacacctat 540

atacactggg tgcgtcaggc cccgggtaag ggcctggaat gggttgcaag gatttatcct 600

acgaatggtt atactagata tgccgatagc gtcaagggcc gtttcactat aagcgcagac 660

acatccaaaa acacagccta cctgcagatg aacagcctgc gtgctgagga cactgccgtc 720

tattattgtt ctagatgggg aggggacggc ttctatgcta tggactactg gggtcaagga 780

accctggtca ccgtctcgag tgagagcaag tacggaccgc cctgcccccc ttgccctgcc 840

cccgagttcc tgggcggacc cagcgtgttc ctgttccccc ccaagcccaa ggacaccctg 900

atgatcagcc ggaccccga ggtgacctgc gtggtggtgg acgtgagcca ggaagatccc 960

gaggtccagt tcaattggta cgtggacggc gtggaagtgc acaacgccaa gaccaagccc 1020

agagaggaac agttcaacag cacctaccgg gtggtgtctg tgctgaccgt gctgcaccag 1080

gactggctga acggcaaaga atacaagtgc aaggtgtcca acaagggcct gcccagcagc 1140

atcgaaaaga ccatcagcaa ggccaagggc cagcctcgcg agccccaggt gtacaccctg 1200

cctccctccc aggaagagat gaccaagaac caggtgtccc tgacctgcct ggtgaagggc 1260

ttctacccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaacg gccagcctga gaacaactac 1320

aagaccaccc ctcccgtgct ggacagcgac ggcagcttct tcctgtacag ccggctgacc 1380

gtggacaaga gccggtggca ggaaggcaac gtctttagct gcagcgtgat gcacgaggcc 1440

ctgcacaacc actacaccca gaagagcctg agcctgtccc tgggcaagat gttctgggtg 1500

ctggtggtgg tgggcggggt gctggcctgc tacagcctgc tggtgacagt ggccttcatc 1560

atcttttggg tgaaacgggg cagaaagaaa ctcctgtata tattcaaaca accatttatg 1620

agaccagtac aaactactca agaggaagat ggctgtagct gccgatttcc agaagaagaa 1680

gaaggaggat gtgaactgcg ggtgaagttc agcagaagcg ccgacgcccc tgcctaccag 1740

cagggccaga atcagctgta caacgagctg aacctgggca gaagggaaga gtacgacgtc 1800

ctggataagc ggagaggccg ggaccctgag atgggcggca agcctcggcg gaagaacccc 1860

caggaaggcc tgtataacga actgcagaaa gacaagatgg ccgaggccta cagcgagatc 1920

ggcatgaagg gcgagcggag gcggggcaag ggccacgacg gcctgtatca gggcctgtcc 1980

accgccacca aggataccta cgacgccctg cacatgcagg ccctgccccc aaggctcgag 2040

ggcggcggag agggcagagg aagtcttcta acatgcggtg acgtggagga gaatcccggc 2100

cctaggatgc ttctcctggt gacaagcctt ctgctctgtg agttaccaca cccagcattc 2160

ctcctgatcc cacgcaaagt gtgtaacgga ataggtattg gtgaatttaa agactcactc 2220

tccataaatg ctacgaatat taaacacttc aaaaactgca cctccatcag tggcgatctc 2280

cacatcctgc cggtggcatt taggggtgac tccttcacac atactcctcc tctggatcca 2340

caggaactgg atattctgaa aaccgtaaag gaaatcacag ggtttttgct gattcaggct 2400

tggcctgaaa acaggacgga cctccatgcc tttgagaacc tagaaatcat acgcggcagg 2460

accaagcaac atggtcagtt ttctcttgca gtcgtcagcc tgaacataac atccttggga 2520

ttacgctccc tcaaggagat aagtgatgga gatgtgataa tttcaggaaa caaaaatttg 2580

tgctatgcaa atacaataaa ctggaaaaaa ctgtttggga cctccggtca gaaaaccaaa 2640

attataagca acagaggtga aaacagctgc aaggccacag gccaggtctg ccatgccttg 2700

tgctcccccg agggctgctg gggcccggag cccagggact gcgtctcttg ccggaatgtc 2760

agccgaggca gggaatgcgt ggacaagtgc aaccttctgg agggtgagcc aagggagttt 2820

gtggagaact ctgagtgcat acagtgccac ccagagtgcc tgcctcaggc catgaacatc 2880

acctgcacag gacggggacc agacaactgt atccagtgtg cccactacat tgacggcccc 2940

cactgcgtca agacctgccc ggcaggagtc atgggagaaa acaacaccct ggtctggaag 3000

tacgcagacg ccggccatgt gtgccacctg tgccatccaa actgcaccta cggatgcact 3060

gggccaggtc ttgaaggctg tccaacgaat gggcctaaga tcccgtccat cgccactggg 3120

atggtggggg ccctcctctt gctgctggtg gtggccctgg ggatcggcct cttcatgtga 3180