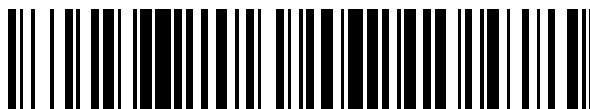


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 123**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.03.2015** **PCT/GB2015/050649**
87 Fecha y número de publicación internacional: **11.09.2015** **WO15132604**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2015** **E 15709320 (4)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018** **EP 3114147**

54 Título: **Receptor quimérico de antígenos**

30 Prioridad:

06.03.2014 GB 201403972

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.06.2018

73 Titular/es:

UCL BUSINESS PLC. (100.0%)
The Network Building 97 Tottenham Court Road
London W1T 4TP, GB

72 Inventor/es:

PULÉ, MARTIN;
ANDERSON, JOHN y
THOMAS, SIMON

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 673 123 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Receptor quimérico de antígenos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un receptor quimérico de antígenos (CAR) que se une al antígeno canceroso disialogangliósido (GD2). Los linfocitos T que expresan dicho CAR son útiles en el tratamiento de enfermedades cancerosas tales como neuroblastoma.

10

Antecedentes de la invención

El disialogangliósido (GD2, pubchem: 6450346) es un glucoesfingolípido que contiene ácido siálico expresado principalmente en la superficie celular. La función de este antígeno de carbohidrato no está completamente entendida; sin embargo, se cree que desempeña una función importante en la adhesión de las células tumorales a las proteínas de matriz extracelular. GD2 se expresa de forma densa, homogénea y casi universal en neuroblastoma. En tejidos normales, la expresión de GD2 está limitada en gran medida a melanocitos de la piel, y vainas de mielina de las fibras de dolor periféricas. Dentro del SNC, GD2 parece ser un antígeno embrionario, pero se encuentra expresado vagamente en oligodendrocitos dispersados y dentro de la pituitaria posterior. Esto hace que GD2 sea muy adecuado para tratamiento antitumoral dirigido.

15

20

25

30

Se han ensayado ampliamente anticuerpos anti-GD2, como tratamiento en neuroblastoma. Dos clones y sus derivados están en uso clínico actual: clon 3F814 y 3F8. Otro clon 14.187 se ha ensayado como una IgG3 de ratón, después del cambio de isotipo a IgG2a (14g2a) y finalmente después de quimerización con IgG1 humana para formar ch14.18. Este último anticuerpo ha producido una clara eficacia en un estudio aleatorizado: el US Children's Oncology Group informó de un estudio en fase III aleatorio de ch14:18 en niños con neuroblastoma de alto riesgo que han conseguido remisión radiológica después del tratamiento inicial. En estos pacientes, hubo una mejora de un 20 % en EFS en el brazo ch14:18 con un seguimiento medio de 2,1 años. De forma importante, La neurotoxicidad muy habitualmente como dolor crónico que induce neuropatía y menos habitualmente una oftalmoplejía es la toxicidad limitante de dosis principal con estos agentes.

35

40

Estos mAb terapéuticos siguen teniendo que refinarse: se ha descrito una inmunocitocina IL-2 derivada de ch14.18. Es un agente bastante tóxico con algún efecto sobre enfermedad residual mínima, pero ninguno contra enfermedad voluminosa. Ch14.18 se ha humanizado completamente y se ha mutado su Fc para inhibir la activación del complemento. Esta versión humanizada de Ch14.18 está en estudio clínico, pero hay únicamente datos muy limitados disponibles. También se ha descrito la humanización del anticuerpo 3F8. Aunque los datos clínicos de seroterapia de GD2 son prometedores, las remisiones completas mantenidas aún están limitadas y no hay evidencias de una función clínicamente útil para los anticuerpos excepto en un entorno de enfermedad mínima.

Por tanto, existe una necesidad de estrategias terapéuticas mejoradas para tratar el neuroblastoma y otros cánceres que expresan GD2.

Receptores quiméricos de antígeno (CAR)

45

50

Los receptores quimérico de antígenos son proteínas que, en su formato habitual, injertan la especificidad de un anticuerpo monoclonal (mAb) con la función efectora de un linfocito T. Su forma habitual es la de una proteína de dominio transmembranario de tipo I con un extremo amino que reconoce antígeno, un espaciador, un dominio transmembranario, todo ello conectado a un endodominio de compuesto que transmite señales de supervivencia y activación de linfocitos T (véase la figura 1a).

55

La forma más habitual de estas moléculas es fusiones de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) derivados de anticuerpos monoclonales que reconocen un antígeno diana, fusionados mediante un espaciador y un dominio transmembranario a un endodominio de señalización. Dichas moléculas producen la activación de los linfocitos T en respuesta al reconocimiento por el scFv de su diana. Cuando los linfocitos T expresan dicho CAR, reconocen y eliminan células diana que expresan el antígeno diana. Se han desarrollado varios CAR contra antígenos asociados a tumor, y las estrategias de transferencia adoptiva usando dichos linfocitos T que expresan CAR están actualmente en ensayo clínico para el tratamiento de diversos cánceres.

60

Se han descrito receptores quimérico de antígeno contra GD2 en que el dominio de unión a antígeno se basa en el scFv 14g2a (documento WO 2013/040371 y Yvon et al., (2009, Clin Cancer Res 15:5852-5860)).

Los linfocitos T humanos que expresan un CAR 14g2a-CD28-OX40-ζ demostraron tener alguna actividad antitumoral, pero no podían erradicar completamente la enfermedad (Yvon et al., (2009) como anteriormente).

65

Los autores de la presente invención buscan generar un CAR dirigido a GD2 alternativo con propiedades mejoradas.

Descripción de las figuras

Figura 1 - Diseño del receptor quimérico de antígenos (CAR).

(a) arquitectura generalizada de un CAR: Un dominio de unión reconoce el antígeno; el espaciador eleva el dominio de unión desde la superficie celular; el dominio transmembranario ancla la proteína a la membrana y el endodominio transmite señales. (b) a (d): Diferentes generaciones y permutaciones de endodominios de CAR: (b) los diseños iniciales transmitían señales ITAM en solitario a través de FcεR1-γ o el endodominio CD3-Zeta, mientras que los diseños posteriores transmitían una (c) o dos (d) señales coestimuladores adicionales en *cis*.

Figura 2 - Variantes de CAR anti-GD2 contruidos (a) CAR anti-GD2 CAR usando anticuerpo de KM666 de ratón como scFv con espaciador de IgG1 humana y endodominio CD28-OX40-Zeta; (b) CAR anti-GD2 CAR usando anticuerpo humanizado de Nakamura huKM666 en el mismo formato que (a); (c) mismo formato que (b) excepto que el dominio Fc está modificado para eliminar los motivos de reconocimiento del receptor Fc; (d) mismo formato que (c) excepto que el espaciador es la bisagra de IgG1 - tallo de CD8; (e) igual que (c) excepto que el espaciador es el tallo de CD8 únicamente; (f) igual que (c) excepto que el espaciador es la bisagra de IgG1 únicamente.

Figura 3 - Comparación de CAR basados en muKM666 y huKM666. (a) Expresión en linfocitos T de sangre periférica de 3 donantes normales; (b) intensidad media de fluorescencia de estos diagramas de facs mostrados como un histograma; (c) Ensayo de liberación de cromo usando linfocitos T no transducidos, linfocitos T transducidos con muKM666 y huKM666, como efectores contra dianas A204 (GD2 negativas), y LAN-1 (GD2 positivas); (d) producción de IL-2 a partir de la misma exposición; (e) producción de interferón-gamma a partir de la misma exposición; y (f) proliferación factorial a partir de la misma exposición.

Figura 4. (a) Construcción retroviral que permite coexpresión 1:1 del gen marcador CD34 con CAR; (b) Análisis de citometría de flujo de la expresión de CAR (marca HA) frente al gen marcador CD34; (c) Ensayo de liberación de cromo de linfocitos T no transducidos y linfocitos T transducidos con las 3 diferentes variantes de CAR contra dianas GD2 positivas (LAN-1) y dianas GD2 negativas (A204); (d) liberación de interferón gamma; (e) liberación de IL-2; y (f) proliferación de las mismas dianas y efectores.

Figura 5 - Introducción de mutaciones que alteran la unión a FcR en el espaciador Fc (a) mutaciones introducidas; (b) Expresión de CAR determinada por tinción anti-Fc: no transducido, wt y mutado; (c) Eliminación de dianas GD2 negativas y GD2 positivas con linfocitos T de CAR anti-GD2 no transducidos, con wt Fc y Fc mutado; (d) Activación de linfocitos T anti-GD2 no transducidos, con wt Fc y Fc mutado con la línea celular que expresa FcR THP-1; liberación de IL-1Beta por la línea celular THP-1 en respuesta a linfocitos T de CAR no transducidos, con wt Fc y Fc mutado.

Figura 6 - Optimización del casete de expresión

(a) optimizaciones del mapa que se introdujeron en el casete: SAR o CHS4; (b) expresión representativa de CAR con diferentes modificaciones con fase de lectura abierta wt o de codones optimizados. La construcción SAR da un pico estricto de expresión que es lo que se desea. (c) Representación de diagrama de barras de estos datos FACS de 3 donantes normales.

Figura 7 - Comparación de diferentes endodominios

Se compararon tres diferentes receptores quimérico de antígenos. Los receptores que comprendían todos el scFv huK666, el dominio Fc de IgG1 se mutaron para reducir la unión a FcR y el dominio transmembranario CD28. El CAR "28tmZ" tiene un endodominio CD3 Zeta; "28Z" tiene un endodominio compuesto CD28 - CD3Zeta; "28OXZ" tiene un endodominio compuesto que comprende CD28, OX40 y CD3Zeta. Los linfocitos T de sangre periférica de donantes normales se transdujeron con estas construcciones con vectores retroviricos de valoraciones similares. Estas diferentes líneas de linfocitos T se compararon, junto con linfocitos T no transducidos como controles. Los linfocitos T se expusieron con células A204 (una línea celular de rhabdomyosarcoma que es GD2 negativa) y células LAN-1 (una línea celular de neuroblastoma que es GD2 positiva). La proliferación y la liberación de citocinas muestran que la actividad del receptor es 28tmZ < 28Z < 28OXZ.

Figura 8 - Coexpresión con el gen suicida iCasp9

(a) Coexpresión de iCasp9 con CAR anti-GD2 usando la secuencia FMD-2A; (b) expresión de CAR en linfocitos T NT, linfocitos T transducidos con GD2CAR y linfocitos T iCasp9-2A-GD2CAR en solitario y después de tratamiento con CID; (c) Eliminación de dianas GD2 positivas (LAN-1) y negativas (A204) con linfocitos T no transducidos, transducidos con GD2CAR y transducidos con iCasp9-2A-GD2CAR con o sin tratamiento con CID. Promedio de 5 linfocitos T donadores normales.

Figura 9 - Coexpresión con el gen suicida RQR8

(a) Se coexpresó CARhuK666Fc con el gen de tipo suicida RQR8 en un vector retroviral. (b) Los linfocitos T se transdujeron con este vector retroviral y se determinó la coexpresión del CAR y RQR8 por tinción de los linfocitos T transducidos con un anticuerpo policlonal anti-Fc y el anticuerpo monoclonal QBend10. (c) La población positiva a CAR de estos linfocitos T pudo reducirse en presencia de Rituximab y complemento. (d) Los linfocitos T reducidos con Rituximab ya no reconocían dianas que expresan GD2.

Figura 10 - (a) Vector bicistónico que expresa sintasa de GM3 y sintasa de GD2. (b) Las células SupT1 transducidas con este vector llegan a ser GD2 positivas (área de gráfica vacía no transducido; área de gráfica en gris transducido).

Figura 11 - Curvas de crecimiento de tumores individuales en ratones en las siguientes cohortes: parte superior izquierda: ratones con tumores CT26 que expresan GD2 que reciben esplenocitos con CAR anti-GD2; parte superior derecha: tumores CT26 que expresan GD2 que reciben esplenocitos con transducción simulada; parte inferior izquierda: tumores CT26 GD2 negativos (wt) con esplenocitos con CAR anti-GD2; parte inferior derecha: y tumores CT26 que expresan GD2 que no reciben esplenocitos

Figura 12 - Secuencias de aminoácidos

- A. CAR anti-GD2 mostrado como (a) en la figura 2 (muKM666-HCH2CH3-CD28OXZ - SEQ ID NO 26)
- B. CAR anti-GD2 mostrado como (b) en la figura 2 (huKM666-HCH2CH3-CD28OXZ - SEQ ID NO 27)
- C. CAR anti-GD2 mostrado como (c) en la figura 2 (huKM666-HCH2CH3pvaa-CD28OXZ - SEQ ID NO 28)
- D. CAR anti-GD2 mostrado como (d) en la figura 2 (huKM666-HSTK-CD28OXZ - SEQ ID NO 29)
- E. CAR anti-GD2 mostrado como (e) en la figura 2 (huKM666-STK-CD28XOXZ - SEQ ID NO 30)
- F. CAR anti-GD2 mostrado como (f) en la figura 2 (huKM666-HNG-CD28OXZ - SEQ ID NO 31)
- G. CAR anti-GD2 CAR mostrado como (c) en la figura 2, pero con endodominio de 1.^a generación (huKM666-HCH2CH3pvaa-CD28tmZ - SEQ ID NO 32)
- H. CAR anti-GD2 mostrado como (c) en la figura 2, pero con endodominio de 2.^a generación (huKM666-HCH2CH3pvaa-CD28Z - SEQ ID NO 33)
- I. CAR anti-GD2 coexpresado con el gen suicida iCasp9 - SEQ ID NO 34
- J. CAR anti-GD2 coexpresado con el gen suicida RQR8 - SEQ ID NO 35

Figura 13 - Estructura de GD2

Figura 14 - Comparación de los CAR huK666 y 14g2a. (a) mapas de construcciones ensayadas: Se ensayaron dos construcciones en linfocitos T primarios. Ambos son vectores retrovirales que codifican RQR8 y un GD2 CAR de 2.^a generación coexpresado con una secuencia de tipo FMD-2A. La única diferencia entre las construcciones es que en una, el scFv es huK666 y en la otra es 14g2a. Los linfocitos T transducidos por estas construcciones se expusieron 1:1 con A204 (una línea celular de rhabdomyosarcoma GD2 negativa) y LAN-1 (una línea celular GD2 positiva). (b) A las 24 horas, se midió el interferón-gamma del sobrenadante. Los linfocitos T con CAR huK666 producen más IFN-γ. (c) Después de una semana se cuentan los linfocitos T, huK666 muestra más proliferación.

Figura 15 - Análisis de citometría de flujo del cocultivo entre CAR de 2.^a generación basados en huK666 o 14g2a y la línea celular de neuroblastoma LAN1. (a) Configuración del experimento. Después de una semana de cocultivo, las células se recogieron y se analizaron por citometría de flujo. La expresión de CD45 permitió la discriminación de células linfoides y células no linfoides siendo las células CD45- células LAN-1. La tinción adicional con CD3/QBEND/10 permitió el recuento de los linfocitos T con CAR. (b) linfocitos T en solitario; (c) linfocitos T NT y células LAN-1; (d) linfocitos T con CAR huK666-28-Z y células LAN-1; (e) linfocitos T con CAR 14g2a-28-Z y células LAN-1. Se observa un residuo de células LAN-1 en el cocultivo de linfocitos T con CAR 14g2a.

Sumario de aspectos de la invención

Los autores de la presente invención han construido un nuevo receptor quimérico de antígenos (CAR) dirigido a GD2 que comprende un dominio de unión a GD2 basado en el anticuerpo K666.

El anticuerpo anti-GD2 14g2a puede observarse como tratamiento de referencia, porque se usa como anticuerpo terapéutico y es el único scFv ensayado hasta la fecha en un estudio de CAR (PMID: 18978797). Los autores de la presente invención compararon CAR basado en 14g2a y huK666 en un formato de segunda generación ya que este es el formato de CAR más ampliamente usado en estudios clínicos. Se descubrió que los linfocitos T con CAR huK666 liberan más IFN-γ, proliferan mejor y eliminan más completamente que los equivalentes 14g2a.

Por tanto, En un primer aspecto, la presente invención proporciona un receptor quimérico de antígenos (CAR) que comprende un dominio de unión a disialogangliósido (GD2), que comprende

- a) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende un dominio VH que tiene la secuencia mostrada como la SEQ ID NO 10 y
- b) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende un dominio VL que tiene la secuencia mostrada como la SEQ ID NO 12.

- 5 El dominio de unión a GD2 puede comprender la secuencia mostrada como la SEQ ID NO 8.
- El dominio de unión a GD2 y el dominio transmembranario pueden conectarse por un espaciador.
- 10 El espaciador puede comprender uno de los siguientes: un dominio Fc de IgG1 humana; una bisagra de IgG1; una bisagra de IgG1-tallo de CD8; o un tallo de CD8.
- El espaciador puede comprender una bisagra de IgG1-tallo de CD8 o un tallo de CD8.
- 15 El espaciador puede comprender un dominio Fc de IgG1 o una variante del mismo.
- El espaciador puede comprender un dominio Fc de IgG1 que comprende la secuencia mostrada como la SEQ ID NO 23 o SEQ ID NO 24 o una variante de las mismas que tenga al menos un 80 % de identidad de secuencia.
- 20 El CAR puede comprender o asociarse con un dominio de señalización de linfocitos T intracelular. El dominio de señalización de linfocitos T intracelular puede comprender uno o más de los siguientes endodominios: endodominio de CD28; endodominio de OX40 y CD3-Zeta.
- 25 El dominio de señalización de linfocitos T intracelular puede comprender todos los siguientes endodominios: endodominio de CD28; endodominio de OX40 y CD3-Zeta.
- El CAR, que comprende un dominio VH y VL que tiene las secuencias mostradas como SEQ ID NO 10 y 12, puede comprender la secuencia mostrada como cualquiera de las SEQ ID NO 27 a 35 o una variante de las mismas que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia pero retiene la capacidad de i) unirse a GD2 y ii) inducir la señalización de linfocitos T.
- 30 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR de acuerdo con el primer aspecto de la invención.
- 35 La secuencia de ácido nucleico puede tener los codones optimizados.
- La secuencia de ácido nucleico, que codifica un CAR de acuerdo con el primer aspecto de la invención, puede comprender la secuencia mostrada como SEQ ID NO 25 o una variante de la misma que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia.
- 40 El ácido nucleico también puede codificar un gen suicida.
- En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con el segundo aspecto de la invención.
- 45 En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona una célula que expresa un CAR de acuerdo con el primer aspecto de la invención. La célula puede ser una célula inmunitaria citolítica, tal como un linfocito T o linfocito citolítico natural (NK).
- 50 La célula puede coexpresar un CAR de acuerdo con el primer aspecto de la invención y un gen suicida.
- El gen suicida puede ser, por ejemplo, iCasp9 o RQR8.
- 55 En un quinto aspecto, la presente invención proporciona un método para generar una célula de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención, que comprende la etapa de introducir un ácido nucleico de acuerdo con el segundo aspecto de la invención *ex vivo* en una célula.
- 60 En un sexto aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un vector de acuerdo con el tercer aspecto de la invención o una célula de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención, junto con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- En un séptimo aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar el cáncer, que comprende la etapa de administrar un vector de acuerdo con el tercer aspecto de la invención o una célula de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención a un sujeto.
- 65 El cáncer puede ser neuroblastoma.

En un octavo aspecto, la presente invención proporciona un vector de acuerdo con el tercer aspecto de la invención o una célula de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención para su uso en el tratamiento de un cáncer.

Descripción detallada

RECEPTORES QUIMÉRICOS DE ANTÍGENOS (CAR)

Los receptores quiméricos de antígenos (CAR), también conocidos como receptores quiméricos de linfocitos T, receptores artificiales de linfocitos T e inmunorreceptores quiméricos, son receptores genomanipulados, que injertan una especificidad arbitraria en una célula efectora inmunitaria. En un CAR clásico, la especificidad de un anticuerpo monoclonal se injerta en un linfocitos T. Los ácidos nucleicos que codifican CAR pueden transferirse a linfocitos T usando, por ejemplo, vectores retrovíricos. De esta manera, puede generarse una gran cantidad de linfocitos T específicos de cáncer para transferencia celular adoptiva. Los estudios clínicos en fase I de esta estrategia muestran eficacia.

El dominio de unión a antígeno diana de un CAR se fusiona habitualmente mediante un espaciador y dominio transmembranario a un endodominio de señalización. Cuando el CAR se une al antígeno diana, esto provoca la transmisión de una señal de activación al linfocito T sobre el que se expresa.

El CAR de la presente invención comprende un dominio de unión a GD2 que está basado en el anticuerpo monoclonal KM666 (Nakamura et al., (2001) Cancer Immunol. Immunother. 50:275-284).

El CAR de la presente invención comprende un dominio de unión a GD2 que comprende

- a) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende un dominio VH que tiene la secuencia mostrada como la SEQ ID NO 10
- b) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende un dominio VL que tiene la secuencia mostrada como la SEQ ID NO 12.

El CAR descrito en este documento comprende un dominio de unión a GD2 que comprende

- a) una región variable de cadena pesada (VH) que tiene regiones determinantes de complementariedad (CDR) con las siguientes secuencias:

CDR1 - SYNIH (SEQ ID NO 1);
 CDR2 - VIWAGGSTNYNSALMS (SEQ ID NO 2)
 CDR3 - RSDDYSWFAY (SEQ ID NO 3); y

- b) una región variable de cadena ligera (VL) que tiene CDR con las siguientes secuencias:

CDR1 - RASSSVSSSYLH (SEQ ID NO 4);
 CDR2 - STSNLAS (SEQ ID NO 5)
 CDR3 - QQYSGYPIT (SEQ ID NO 6). No es parte de la invención, aunque de acuerdo con la divulgación puede ser posible introducir una o más mutaciones (sustituciones, adiciones o eliminaciones) en cada CDR sin afectar de forma negativa a la actividad de unión a GD2. Cada CDR puede tener, por ejemplo, una, dos o tres mutaciones de aminoácido.

La secuencia de KM666 murina tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como la SEQ ID NO 7. SEQ ID NO 7 (secuencia de KM666 murina)

QVQLKESGPVLVAPSQTLSITCTVSGFSLASYNIIHWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGS
 TNYNSALMSRLSISKDNSKSQVFLQMNSLQTDDTAMYYCAKRSDDYSWFAYWGQG
 TLVTVSASGGGGSGGGGSGGGGSENVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSS
 YLHWYQQKSGASPKVWIYSTSNLASGVPGRFSGSGSGTSYSLTISSVEAEDAATYY
 CQQYSGYPITFGAGTKVEVKR

Esta secuencia comprende las siguientes secuencias VH y VL:

SEQ ID NO 9 (secuencia de VH de KM666)

QVQLKESGPVLVAPSQTLSTCTVSGFSLASYNHWRQPPGKGLEWLGVIWAGGS
 TNYNSALMSRLSISKDNSKSQVFLQMNSLQTDDETAMYYCAKRSDDYSWFAYWGQG
 TLVTVSA

SEQ ID NO 11 (secuencia de VL de KM666)

ENVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSSSYLHWYQQKSGASPKVWIYSTSNLA
 SGVPGRFSGSGSGTSYSLTISSVEAEDAATYYCQQYSGYPITFGAGTKVEVK

El CAR de la presente invención puede comprender la siguiente secuencia de aminoácidos:

SEQ ID NO 8 (secuencia de KM666 humanizada)

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGFSLASYNHWRQPPGKGLEWLGVIWAGGS
 TNYNSALMSRLTISKDNSKNQVFLKMSSSLTAADTAVYYCAKRSDDYSWFAYWGQG
 TLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSENQMTQSPSSLSASVGDRVTMTCRASSSVSS
 YLHWYQQKSGKAPKVIWYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYY
 CQQYSGYPITFGGQGTKVEIKR

El CAR de la presente invención comprende la siguiente secuencia de VH:

SEQ ID NO 10 (secuencia de VH de KM666 humanizada)

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGFSLASYNHWRQPPGKGLEWLGVIWAGGS
 TNYNSALMSRLTISKDNSKNQVFLKMSSSLTAADTAVYYCAKRSDDYSWFAYWGQG
 TLVTVSS

El CAR de la presente invención comprende la siguiente secuencia de VL:

SEQ ID NO 12 (secuencia de VH de KM666 humanizada)

ENQMTQSPSSLSASVGDRVTMTCRASSSVSSSYLHWYQQKSGKAPKVIWYSTSNL
 ASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYSGYPITFGGQGTKVEIK

El porcentaje de identidad entre dos secuencias polipeptídicas puede determinarse fácilmente por programas tales como BLAST que está libremente disponible en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>.

DOMINIO TRANSMEMBRANARIO

El CAR de la invención también puede comprender un dominio transmembranario que abarca la membrana. Puede comprender una hélice alfa hidrófoba. El dominio transmembranario puede obtenerse de CD28, que da una buena estabilidad de receptor.

El dominio transmembranario puede comprender la secuencia mostrada como la SEQ ID NO 13.

SEQ ID NO 13

FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV

DOMINIO DE SEÑALIZACIÓN DE LINFOCITOS T INTRACELULARES (ENDODOMINIO)

El endodominio es la parte de transmisión de señales del CAR. Después del reconocimiento de antígeno, los receptores se agrupan y se transmite una señal a la célula. El componente de endodominio más habitualmente usado es el de CD3-zeta que contiene 3 ITAM. Este transmite una señal de activación a linfocito T después de que se una el antígeno. CD3-zeta puede no proporcionar una señal de activación completamente competente y puede necesitarse una señalización coestimuladora adicional. Por ejemplo, puede usarse CD28 quimérica y OX40 con CD3-Zeta para transmitir una señal proliferativa/de supervivencia, o pueden usarse los tras conjuntamente.

El endodominio del CAR de la presente invención puede comprender el endodominio de CD28 y el endodominio de OX40 y CD3-Zeta.

El dominio transmembranario y de señalización de linfocitos T intracelular (endodominio) del CAR de la presente invención pueden comprender la secuencia mostrada como las SEQ ID NO 14, 15, 16, 17 o 18 o una variante de las mismas que tengan al menos un 80 % de identidad de secuencia.

5 SEQ ID NO 14 (endodominio de CD28)
RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAY

SEQ ID NO 15 (endodominio de CD40)
RSRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI

10 SEQ ID NO 16 (endodominio de CD3 zeta)

RSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK
NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ
ALPPR

15 SEQ ID NO 17 (CD28Z)

RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQ
QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA
EAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

20 SEQ ID NO 18 (CD28OXZ)

RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRDQRLPPDAHKKPPG
GGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDV
LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDG
LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

25 Una secuencia variante puede tener al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO 13, 14, 15, 16, 17 o 18, con la condición de que la secuencia proporcione un dominio transmembranario/dominio de señalización de linfocitos T intracelular eficaz.

PÉPTIDO SEÑAL

30 El CAR de la presente invención puede comprender un péptido señal de modo que, cuando el CAR se exprese dentro de una célula, tal como un linfocito T, la proteína naciente se dirija al retículo endoplasmático y posteriormente a la superficie celular, donde se expresa.

35 El núcleo del péptido señal puede comprender un largo tramo de aminoácidos hidrófobos que tiene tendencia a formar una única hélice alfa. El péptido señal puede empezar con un corto tramo cargado positivamente de aminoácidos, que ayuda a garantizar la topología apropiada del polipéptido durante el traslado. Al final del péptido señal típicamente hay un tramo de aminoácidos que se reconoce y escinde por peptidasa señal. La peptidasa señal puede escindir durante o después de completarse el traslado para generar un péptido señal libre y una proteína madura. Los péptidos señal libres entonces se digieren por proteasas específicas.

40 El péptido señal puede estar en el extremo amino de la molécula.

El CAR de la invención puede tener la fórmula general:

45 Péptido señal - dominio de unión a GD2 - dominio espaciador - dominio transmembranario - dominio de señalización de linfocitos T intracelular.

El péptido señal puede comprender la SEQ ID NO 19 o una variante de la misma que tiene 5, 4, 3, 2 o 1 mutaciones de aminoácido (inserciones, sustituciones o adiciones) con la condición de que el péptido señal aún funcione causando la expresión del CAR en la superficie celular.

50 SEQ ID NO 19: METDTLLLWVLLLWVPGSTG

El péptido señal de la SEQ ID NO 19 es compacto y altamente eficaz. Se predice que dará aproximadamente un 95 % de escisión después de la glicina terminal, dando una eliminación eficaz por la peptidasa señal.

ESPACIADOR

El CAR de la presente invención puede comprender una secuencia espaciadora para conectar el dominio de unión a GD2 con el dominio transmembranario y conectar espacialmente el dominio de unión a GD2 desde el endodominio. Un espaciador flexible permite que el dominio de unión a GD2 se oriente en diferentes direcciones para posibilitar la unión de GD2.

La secuencia espaciadora puede comprender, por ejemplo, una región Fc de IgG1, una bisagra de IgG1 o un tallo de CD8, o una combinación de los mismos. El espaciador puede comprender, de forma alternativa, una secuencia alternativa que tiene longitud y/o propiedades espaciadoras de dominios similares como una región Fc de IgG1, una bisagra de IgG1 o un tallo de CD8.

Un espaciador de IgG1 humana puede alterarse para eliminar los motivos de unión a Fc.

Los ejemplos de secuencias de aminoácidos para estos espaciadores se dan a continuación:

SEQ ID NO 20 (bisagra CH2CH3 de IgG1 humana)

AEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGKKD

SEQ ID NO 21 (tallo de CD8 humana):

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI

SEQ ID NO 22 (bisagra de IgG1 humana):

AEPKSPDKTHTCPPCKDPK

SEQ ID NO 23 (bisagra-Fc de IgG1)

AEPKSPDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGKKDPK

SEQ ID NO 24 (bisagra - Fc de IgG1 modificada para eliminar los motivos de reconocimiento del receptor de Fc)

AEPKSPDKTHTCPPCPAPPVA*GPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGKKDPK

Los restos modificados están subrayados; * indica una eliminación.

GD2

GD2 es un disialogangliósido expresado en tumores de origen neuroectodérmico, incluyendo neuroblastoma y melanoma humano, con expresión altamente restringida en tejido normales, principalmente al cerebelo y los nervios periféricos en seres humanos.

- 5 La expresión relativamente específica de tumor de GD2 hace que sea una diana adecuada para inmunoterapia.

SECUENCIA DE ÁCIDO NUCLEICO

- 10 El segundo aspecto de la invención se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR del primer aspecto de la invención.

La secuencia de ácido nucleico puede ser capaz de codificar un CAR que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como cualquiera de las SEQ ID NO 27-35. La secuencia de ácido nucleico puede ser o comprende la siguiente secuencia:

- 15 SEQ ID NO 25 secuencia de ADN de casete retrovírico que comprende CAR anti-GD2 coexpresado con el gen suicida RQR8 con una fase de codones optimizados y una región SAR para potenciar la expresión

```

1  tgaaagaccc cacctgtagg tttggcaagc tagcttaagt aacgccattt tgcaaggcat ggaaaaatac
71  ataactgaga atagaaaagt tcagatcaag gtcaggaaca gatggaacag ctgaatatgg gccaaacagg
141  atatctgtgg taagcagttc ctgccccggc tcagggccaa gaacagatgg aacagctgaa tatgggccaa
211  acaggatatc tgtggtaagc agttcctgcc ccggctcagg gccaagaaca gatgggtccc agatgcggtc
281  cagccctcag cagtttctag agaaccatca gatgtttcca gggtgcccca aggacctgaa atgacctgt
351  gccttatttg aactaaccaa tcagttcgct tctcgcttct gtgcgcgcgc ttatgctccc cgagctcaat
421  aaaagagccc acaaccctc actcggggcg ccagtcctcc gattgactga gtgcgccggg taccctgtga
491  tccaataaac cctcttgtag ttgcatccga cttgtggtct cgctgttcct tgggagggtc tcctctgagt
561  gattgactac ccgtcagcgg gggcttttca tttgggggct cgtccgggat cgggagaccc ctgccaggg
631  accaccgacc caccaccggg aggtaagctg gccagcaact tatctgtgtc tgtccgattg tctagtgtct
701  atgactgatt ttatgcgcct gcgtcggtag tagttagcta actagctctg tatctggcgg acccgtggtg

```

20

```

771 gaactgacga gttcggaaca cccggccgca accctgggag acgtcccagg gacttcgggg gccgtttttg
      PshAI
      -----
841 tggcccgacc tgagtcctaa aatcccgatc gtttaggact ctttggtgca ccccccttag aggagggata

911 tgtggttctg gtaggagacg agaacctaaa acagttcccg cctccgtctg aatttttgc ttcggtttgg
981 gaccgaagcc gcgccgcgcg tcttgtctgc tgcagcatcg ttctgtgttg tctctgtctg actgtgttct

      SrfI
      -----
1051 tgtatttgtc tgaaaatatg ggcccgggct agcctgttac cactccctta agtttgacct taggtcactg
1121 gaaagatgtc gagcggatcg ctcaacaacca gtcggtagat gtcaagaaga gacgttgggt taccttctgc
1191 tctgcagaat ggccaacctt taacgtcggg tggccgcgag acggcacctt taaccgagac ctcacacccc
1261 aggttaagat caaggtcttt tcacctggcc cgcctgggaca cccagaccag gtgggttaca tctgtacctg
1331 ggaagccttg gcttttgacc cccctccctg ggtcaagccc ttgtacacc ctaagcctcc gcctcctctt
1401 cctccatccg ccccgctctc ccccttgaa cctcctcgtt cgaccccgcc tcgatcctcc ctttatccag

      BglII
      -----
1471 ccctcactcc ttctctaggg gcccctatat ggccatatga gatcttatat ggggcacccc cgccccttgt
1541 aaacttcctt gaccctgaca tgacaagagt tactaacagc ccctctctcc aagctcactt acaggtctct

      AgeI
      -----
1611 tacttagtcc agcacgaagt ctggagacct ctggcggcag cctaccaaga acaactggac cgaccggtgg
1681 tacctcacc ttaccgagtc ggcgacacag tgtgggtccg ccgacaccag actaagaacc tagaacctcg

      AccI
      -----
1751 ctggaagga cttacacag tctgtctgac cacccccacc gccctcaaag tagacggcat cgcagcttgg

      PmlI
      -----
1821 atacacgccg cccacgtgaa ggctgccgac cccgggggtg gaccatctc tagactgcca acatgggcac
                                     >>.orf.>
                                     >>RQR8.>

1891 cagcctgctg tgctggatgg ccctgtgcct gctgggcgcc gaccacgccg atgcctgcc ctacagcaac
>.....orf.....>
>.....RQR8.....>

1961 cccagcctgt gcagcgagg cggcggcagc gagctgcca cccaggcac cttctccaac gtgtccacca
>.....orf.....>
>.....RQR8.....>

2031 acgtgagccc agccaagccc accaccaccg cctgtcctta ttccaatcct tccctgtgta gcggaggggg
>.....orf.....>
>.....RQR8.....>

2101 aggcagccca gccccagac etcccacccc agccccacc atcgccagcc agcctctgag cctgagaccc
>.....orf.....>
>.....RQR8.....>

      SgrAI
      -----
2171 gaggcctgcc gccacggcgc cgccggcgcc gtgcacaacca gaggcctgga ttgcctgc gatatttaca
>.....orf.....>
>.....RQR8.....>

      BclI
      -----
2241 tctgggcccc actggccggc acctgtggcg tgctgtgct gagcctggtg atcacctgt actgcaacca

```

```

>.....orf.....>
>.....RQR8.....>

2311 ccgcaaccgc aggcgcgtgt gcaagtcccc caggcccggtg gtgagagccg agggcagagg cagcctgctg
>.....orf.....>
>.....RQR8.....>>
>>.....FMD-2A.....>

                                NcoI
                                -----
2381 acctgcggcg acgtggagga gaaccagggc cccatggaga ccgacaccct gctgctgtgg gtgctgctgc
>.....orf.....>
>.....FMD-2A.....>>
>>.....CAR.....>

2451 tgtgggtgcc aggcagcacc ggccaggtgc agctgcagga gtctggccca ggccctgtga agccagacca
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

2521 gaccctgagc atcacctgca ccgtgagcgg cttcagcctg gccagctaca acatccaactg ggtgcggcag
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

2591 cccccaggca agggcctgga gtgctgtggc gtgatctggg ctggcggcag caccaactac aacagcgccc
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

2661 tgatgagccg gctgaccatc agcaaggaca acagcaagaa ccaggtgttc ctgaagatga gcagcctgac
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

2731 agccgccgac accgcctgtg actactgcgc caagcggagc gacgactaca gctggttcgc ctactggggc
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

2801 cagggcaccc tggtagccgt gagctctggc ggaggcggct ctggcggagg cggctctggc ggaggcggca
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

2871 gcgagaacca gatgaccagc agccccagca gcttgagcgc cagcgtgggc gaccgggtga ccatgacctg
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

2941 cagagccagc agcagcgtga gcagcagcta cctgcactgg taccagcaga agagcggcaa ggccccaaag
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

3011 gtgtggatct acagcaccag caacctggcc agcggcgtgc ccagccggtt cagcggcagc ggcagcggca
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

3081 ccgactacac cctgaccatc agcagcctgc agccccagga ctccgccacc tactactgcc agcagtacag
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

                                BamHI
                                -----
3151 cggctacccc atcaccttcg gccagggcac caaggtggag atcaagcggc cggatccgc cgagcccaaa
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

                                FseI
                                -----
3221 tctcctgaca aaactcacac atgcccacgc tgcccagcac ctcccgtggc cggcccgtea gtcttctct
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

3291 tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tcgcccggac cctgaggtc acatgcgtgg tggtagcgt
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

3361 gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtagctg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

```

```

      SacII
      -----
3431 aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

3501 ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agcctccca gccccatcg agaaaaccat
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

3571 ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga tgagctgacc
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

3641 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagggggaga
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

3711 gcaatgggca accggagAAC aactacaaga ccagcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttct
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

Ppu10I
-----
NsiI
-----
BfrBI
-----

3781 ctacagcaag ctaccgtgg acaagagcag gtggcagcag ggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

Van91I
-----

3851 gaggcctgc acaatcacta taccagaaa tctctgagtc tgagcccagg caagaaggac cccaagtct
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

3921 gggctcctgt ggtggggga ggcgtgctgg cctgttactc tctcctggtg accgtggcct tcatcatctt
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

3991 ctgggtgctc tccaagagga gcaggctcct gcacagtgc tacatgaaca tgactccccg ccgccccggg
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

4061 cccaccgcga agcattacca gccctatgcc ccaccacgcg acttcgcagc ctatcgctcc cgggtgaagt
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

4131 tctctcgtc tgccgatgcc ccagcctatc agcagggccga gaatcagctg tacaatgaac tgaacctggg
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

4201 caggcgggag gactacgacg tgctggataa gcggagaggc agagaccccg agatgggcg caaaccacgg
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

4271 cgcaaaaatc cccaggaggg actctataac gagctgcaga aggacaaaat ggccgaggcc tattccgaga
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

4341 tcggcatgaa gggagagaga agacgcggaa agggccacga cggcctgtat cagggtattgt ccaccgctac
>.....orf.....>
>.....CAR.....>

MluI ClaI
-----

4411 aaaagataca tatgatgcc tgcacatgca gccctgccca cccagatgac gcgtatcgat actgttctca
>.....orf.....>>
>.....CAR.....>>
>>..SAR..>

4481 tcacatcata tcaaggttat ataccatcaa tattgccaca gatgttactt agccttttaa tatttctcta
>.....SAR.....>

```

```

4551 atttagtgta tatgcaatga tagttctctg atttctgaga ttgagtttct catgtgtaat gattatttag
>.....SAR.....>

4621 agtttctctt tcatctgttc aaatttttgt ctagttttat ttttactga tttgtaagac ttctttttat
>.....SAR.....>

4691 aatctgcata ttacaattct ctttactggg gtgttgcaaa tattttctgt cattctatgg cctgactttt
>.....SAR.....>

4761 cttaatgggt ttttaatttt aaaaataagt cttaatattc atgcaatcta attaacaatc ttttctttgt
>.....SAR.....>

                                     SphI
                                     -----
4831 ggtaggact ttgagtcata agaaattttt ctctacactg aagtcatgat ggcatgcttc tatattattt
>.....SAR.....>

4901 tctaaaagat ttaaagtttt gccttctcca ttagactta taattcactg gaattttttt gtgtgtatgg
>.....SAR.....>

4971 tatgacatat gggttccctt ttatttttta catataaata tatttccttg tttttctaaa aaagaaaaag
>.....SAR.....>

5041 atcatcattt tcccattgta aaatgccata tttttttcat aggtcactta catatatcaa tgggtctgtt
>.....SAR.....>

5111 tctgagctct actctatttt atcagcctca ctgtctatcc ccacacatct catgctttgc tctaaatctt
>.....SAR.....>

5181 gatatttagt ggaacattct tcccattttt gttctacaag aatatttttg ttattgtctt tgggtcttct
>.....SAR.....>

5251 atatacattt tgaaatgagg ttgacaagtt cggattagtc caatttgta aagacaggat atcagtggtc
>.....SAR.....>>

5321 caggctctag ttttgactca acaatatcac cagctgaagc ctatagagta cgagccatag ataaaataaa
>.....SAR.....>

5391 agattttatt tagtctccag aaaaaggggg gaatgaaaga cccacctgt aggtttggca agctagctta
>>.....LTR.....>

5461 agtaacgcca ttttgcaagg catggaaaaa tacataactg agaatagaga agttcagatc aaggtcagga
>.....LTR.....>

5531 acagatggaa cagctgaata tgggccaac aggatatctg tggttaagcag ttctgcccc ggctcagggc
>.....LTR.....>

5601 caagaacaga tggaacagct gaatatgggc caaacaggat atctgtgga agcagttcct gccccggctc
>.....LTR.....>

5671 agggccaaga acagatggtc cccagatgag gtccagccct cagcagtttc tagagaacca tcagatgttt
>.....LTR.....>

5741 ccagggtgcc ccaaggacct gaaatgacct tgtgccttat ttgaactaac caatcagttc gcttctcgt
>.....LTR.....>

5811 tctgttcgag cgcttctgct ccccgagctc aataaaagag cccacaacct ctactcggg gcgccagtc
>.....LTR.....>

5881 tccgattgac tgagtcgccc gggtagccgt gtatccaata aacctcttg cagttgcac cgacttggtg
>.....LTR.....>

5951 tctcgtggtt ccttgggagg gtctcctctg agtgattgac taccgctcag cgggggtctt tcac
>.....LTR.....>>

```

La secuencia de ácido nucleico puede codificar la misma secuencia de aminoácidos que la codificada por la SEQ ID NO 25, pero puede tener una secuencia de ácido nucleico diferente, debido a la degeneración del código genético. La secuencia de ácido nucleico puede tener al menos un 80, 85, 90, 95, 98 o 99 % de identidad con la secuencia mostrada como la SEQ ID NO 25, con la condición de que codifique un CAR como se define en el primer aspecto de la invención.

GENES SUICIDAS

Como los linfocitos T se injertan y son autónomos, se desea un medio de eliminación selectiva de linfocitos T con CAR en destinatarios de linfocitos T con CAR anti-GD2. Los genes suicidas son mecanismos genéticamente codificables que provocan la destrucción selectiva de linfocitos T infundidos haciendo frente a la toxicidad inaceptable. La experiencia clínica inicial con genes suicidas con la timidina cinasa del virus del herpes (VHS-TK) que hace que los linfocitos T sean susceptibles a Ganciclovir. La VHS-TK es un gen suicida altamente eficaz. Sin embargo, las respuestas inmunitarias preformadas pueden restringir su uso a entornos clínicos de inmunosupresión considerable tal como trasplante de células madre haploidénticas. La caspasa 9 inducible (iCasp9) es un gen suicida construido por remplazo del dominio de activación de caspasa 9 con un FKBP12 modificado. La iCasp9 se activa por un inductor químico molecular pequeño por lo demás inerte de dimerización (CID). La iCasp9 se ha ensayado recientemente en el entorno de HSCT haploidéntico y puede anular GvHD. La mayor limitación de iCasp9 es la dependencia en la disponibilidad de CID patentado de calidad clínica. Tanto iCasp9 como HSV-TK son proteínas intracelulares, de modo que cuando se usaron como único transgén, se han coexpresado con un gen marcador para permitir la selección de células transducidas.

Una iCasp9 puede comprender la secuencia mostrada como la SEQ ID NO 36 o una variante de la misma que tiene al menos un 80, 90, 95 o 98 % de identidad de secuencia.

SEQ ID NO 36

MLEGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSDRNKPFFKMLGK
QEVIRGWEEGVAQMSVVGQRAKLTISPDIYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLESG
GGSGVDGFGDVGALSLRGNADLAYILSMEPCGHCLINNPNFCRESGLRTRTGSNI
DCEKLRRRFFSSLHFMVEVKGDLTAKKMLALLELAQQDHGALDCCVVILSHGCQA
SHLQFPGAVYGTGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEV
ASTSPEDESPGSNPEPDATPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWR
DPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKL
FFKTSAS

Los autores de la presente invención han descrito recientemente un gen marcador/suicida novedoso conocido como RQR8 que puede detectarse con el anticuerpo QBEnd10 y que se expresa en células lisadas con el anticuerpo terapéutico Rituximab.

Un RQR8 puede comprender la secuencia mostrada como la SEQ ID NO 37 o una variante de la misma que tiene al menos un 80, 90, 95 o 98 % de identidad de secuencia.

SEQ ID NO 37

MGTSLLCWMALCLLGADHADACPYSNPSLCSGGGGSELPTQGTFNSVSTNVSPAK
PTTTACPYSNPSLCSGGGGSPAPRPPTPAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG
LDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVV

El gen suicida puede expresarse como un único polipéptido con el CAR, por ejemplo, usando un péptido de autoescisión entre las dos secuencias.

VECTOR

La presente invención también proporciona un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. Dicho vector puede usarse para introducir la secuencia de ácido nucleico en una célula hospedadora de modo que exprese y produzca una molécula de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

El vector puede ser, por ejemplo, un plásmido o un vector vírico, tal como un vector retrovílico o un vector lentivílico.

El vector puede ser capaz de transfectar o transducir un linfocito T.

El vector también puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen suicida, tal como iCasp9 o RQR8.

CÉLULA HOSPEDADORA

La invención también proporciona una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la invención. La célula hospedadora puede ser capaz de expresar un CAR de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

La célula hospedadora puede ser una célula inmunitaria citolítica tal como un linfocito T o linfocito citolítico natural (NK) humano.

Un linfocito T que pueda expresar un CAR de acuerdo con la invención puede generarse transduciendo o transfectando un linfocito T con ácido nucleico que codifique CAR.

El linfocito T con CAR puede generarse *ex vivo*. El linfocito T puede ser de una muestra de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) del paciente o un donante. Los linfocitos T pueden activarse y/o expandirse antes de transducirse con ácido nucleico que codifica CAR, por ejemplo, por tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-CD3.

COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que contiene un vector o un linfocito T que expresa CAR de la invención junto con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, uno o más polipéptidos y/o compuestos farmacéuticamente activos adicionales. Dicha formulación puede estar, por ejemplo, en una forma adecuada para infusión intravenosa.

MÉTODO DE TRATAMIENTO

Los linfocitos T que expresan una molécula CAR de la presente invención pueden eliminar células cancerosas, tales como células de neuroblastoma. Los linfocitos T que expresan CAR pueden crearse *ex vivo* a partir de la sangre periférica del propio paciente (1.^a parte) o en el entorno de un trasplante de células madre hematopoyéticas de sangre periférica donante (2.^a parte) o de sangre periférica de un donante no relacionado (3.^a parte). Como alternativa, los linfocitos T con CAR pueden obtenerse de diferenciación *ex-vivo* de células progenitoras inducibles o células progenitoras embrionarias en linfocitos T. En estos casos, los linfocitos T con CAR se generan introduciendo ADN o ARN que codifica el CAR por uno de muchos medios que incluyen transducción con un vector vírico, transfección con ADN o ARN.

Los linfocitos T que expresan una molécula CAR de la presente invención pueden usarse para el tratamiento de una enfermedad cancerosa, en particular, una enfermedad cancerosa asociada con expresión de GD2.

El cáncer puede ser un tumor ectodérmico.

Los ejemplos de cánceres que se correlacionan con niveles elevados de expresión de GD2 son: neuroblastoma, melanoma, meduloblastoma, sarcomas de tejido blando, osteosarcoma y cánceres broncopulmonares microcíticos tales como NSCLC.

Un método para el tratamiento de enfermedades se refiere al uso terapéutico de un vector o linfocito T de la invención. A este respecto, el vector o linfocito T puede administrarse a un sujeto que tiene una enfermedad o afección existente para atenuar, reducir o mejorar al menos un síntoma asociado con la enfermedad y/o para ralentizar, reducir o bloquear la progresión de la enfermedad. El método de la invención puede causar o promover la eliminación mediada por linfocitos T de células que expresan GD2, tales como células cancerosas.

CÉLULA QUE EXPRESA GD2

En este documento se describe un método para generar una célula que expresa GD2, que comprende la etapa de introducir un ácido nucleico que codifica la sintasa de GM3 y un ácido nucleico que codifica la sintasa de GD2 en una célula.

El ácido nucleico puede introducirse por, por ejemplo, transfección o transducción, usando un vector tal como un plásmido o vector vírico.

En este documento se describe una célula que expresa GD2, que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica la sintasa de GM3 y un ácido nucleico heterólogo que codifica la sintasa de GD2.

El ácido nucleico puede ser "heterólogo" en el sentido de que no está habitualmente presente en la célula. Es una secuencia de ácido nucleico recombinante introducida de forma artificial.

La célula puede ser de una línea celular.

La célula puede usarse para estimular linfocitos T con GD2CAR en cultivo, tales como los linfocitos T de la presente invención.

La invención se describirá ahora adicionalmente mediante ejemplos, que pretenden servir para ayudar a un experto habitual en la materia a poner en práctica la invención y de ninguna manera pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1- Uso del anticuerpo humanizado huK666 como un agente de unión

Se construyeron CAR con scFv usando secuencias del anticuerpo de ratón KM666 o su versión humanizada huK666 como se describe por Nakamura et al., (2001 - como anteriormente) (variantes (a) y (b) en la figura 2 anterior). Estos receptores se compararon para la expresión/estabilidad y se descubrió que eran iguales para ambos receptores. A continuación, se ensayó la eliminación, liberación de citocinas y proliferación de linfocitos T transducidos con estos receptores cuando se exponían a células diana que no expresan o que expresan GD2. Se concluyó que la eliminación de ambos receptores era similar, pero el receptor basado en scFv humanizado provocaba una producción de IL2 y una proliferación superior (figura 3).

Ejemplo 2 - Ensayo del efecto de diferentes efectos de formatos de espaciador sobre la expresión y la función

Se generaron CAR anti-GD2 con espaciador Fc, bisagra, bisagra-tallo de CD8 y tallo de Cd8 (figura 2 (b), (d), (e) y (f) respectivamente). Estos CAR se coexpresaron con el gen marcador, CD34 truncada, de una manera 1:1 obligatoria con el péptido de autoescisión de fiebre aftosa 2A para permitir una comparación precisa (figura 4a). Además, el scFv huK666 se marcó con una marca HA del extremo amino para permitir la comparación del transgén frente a la expresión del CAR.

El análisis citométrico de flujo de linfocitos T donadores normales transducidos con estas construcciones demostró una expresión de CAR más clara en el siguiente orden: Fc > Bisagra-tallo = tallo > bisagra (figura 4b).

La eliminación de dianas GD2 positivas respecto a dianas GD2 negativas se comparó usando ensayos de liberación de cromo. Esto demostró una eficacia de eliminación en el siguiente orden: Fc > Bisagra-tallo = tallo > bisagra (figura 4c).

Se comparó la liberación de interferón-gamma e IL-2 cuando los linfocitos T con CAR se exponían a dianas GD2 positivas o negativas. La liberación de interferón-gamma fue similar en CAR con Fc, bisagra-tallo y tallo, pero menor en la variante de bisagra. La liberación de IL2 se detectó en el siguiente orden: Fc, tallo, bisagra-tallo, bisagra (figura 4d y e).

Finalmente, se comparó la proliferación de linfocitos T con CAR cuando se exponían linfocitos T con CAR a diana GD2 positivas o negativas. La proliferación se detectó en el siguiente orden: Tallo, bisagra-tallo, Fc, bisagra (figura 4d y e).

Ejemplo 3 - Mutaciones de FcR anulan la actividad no específica

Los datos globales de los ejemplos anteriores sugirieron que el espaciador Fc funciona mejor de manera global. Sin embargo, el dominio Fc *in vivo* puede dar lugar a activación no específica de células que expresan receptores FC. Para anular este efecto, se introdujeron mutaciones en la región Fc como se muestra en la figura 5(a). Estas mutaciones no tienen efectos perjudiciales sobre la expresión de CAR, como se muestra en la figura 5(b).

Además, se demostró que estas mutaciones no tenían efecto sobre la función de eliminación de CAR (figura 5(c)). Finalmente, se demostró que estas mutaciones tenían el efecto deseado en términos de eliminación no específica de dianas que expresan FcR (una línea monocitoide llamada THP1) y la liberación de IL-1Beta por estos monocitos (figura 5e).

Ejemplo 4 - Optimización del casete de expresión

Con vistas a optimizar la expresión del receptor, se ensayó lo siguiente: (a) inclusión de una región de adhesión estructural (SAR) en el casete; (b) inclusión de aislante de cromatina de hemoglobina beta de pollo (CHS4) en el LTR3' y (c) optimización de codones de la fase de lectura abierta (figura 6a). Se demostró que la inclusión de un SAR mejoraba la naturaleza de la expresión igual que la optimización de codones, mientras que el CHS4 tuvo poco

efecto (figura 6b). Combinando SAR y la optimización de codones, se mejoró la expresión de forma aditiva (figura 6c)

Ejemplo 5 - Comparación de diferentes endodominios

Se generaron construcciones con tres endodominios diferentes: dominio transmembranario de CD28 con endodominio de CD3-zeta (CD28tmZ); dominio transmembranario de CD28 con endodominio de CD28 y endodominio de CD3-zeta (CD28Z), y dominio transmembranario de CD28, endodominio de CD28, endodominio de OX30 y endodominio de CD3-zeta (CD28OXZ) con un CAR en el formato de Fc espaciador. Se observó que la proliferación, la liberación de IFN γ y la liberación de IL-2 aumentaban en el orden de CD28tmZ < CD28Z < CD28OXZ (figura 7).

Ejemplo 6 - Coexpresión con el gen suicida iCasp9

El gen suicida iCasp9 se coexpresó con el CAR anti-GD2 (figura 8a - el CAR estaba en el formato de Fc-espaciador, CD28OXZ elegido arbitrariamente para demostrar la función). El CAR podía expresarse bien a pesar de la coexpresión con iCasp9 (figura 8b). La activación de iCasp9 con el dimerizador molecular pequeño dio lugar a la eliminación de linfocitos T CAR positivos (figura 8b). Los linfocitos T iCasp9-GD2CAR expuestos a este dimerizador perdían su especificidad de GD2 cuando se exponían al dimerizador (figura 8c).

Ejemplo 7 - Coexpresión con el gen suicida RQR8

El CAR anti-GD2 se coexpresó con el gen de tipo suicida RQR8. (Figura 9a - el CAR está en el formato de Fc-espaciador, CD28Z elegido arbitrariamente para demostrar la función). Fue posible coexpresar el receptor y CAR (figura 9b). La activación de la función de gen suicida de RQR8 con Rituximab y el complemento produjo la eliminación de linfocitos T transducidos y la pérdida de reconocimiento de GD2 (figura 9c y d).

Ejemplo 8 - La expresión de la sintasa de GD2 y la sintasa de GM3 provoca la expresión de GD2 en cualquier línea celular

Para estimular los linfocitos T GD2CAR en cultivo, para obtener dianas GD2- o GD2+ ideales y para poder generar células singénicas para modelos animales pequeños, se desea poder expresar de forma transgénica GD2 en una línea celular. GD2 no es una proteína y tiene que sintetizarse por un conjunto complejo de enzimas. En esta ocasión, se demuestra que la expresión transgénica de solamente dos enzimas: sintasa de GM3 y sintasa de GD2 provoca una expresión clara de GD2 en todas las líneas celulares transducidas hasta ahora (figura 10).

Ejemplo 9 - Función *in vivo* del CAR anti-GD2

La línea celular CT26 se genomanipuló para que expresara GD2 como se describe anteriormente (denominada clon CT26 n.º 7 o CT25 n.º 7 para acortar). Se inocularon 2×10^5 de células CT26 de tipo silvestre (wt) o GD2 positivas en los flancos de ratones C57BL/6 (singénicos con CT26). Unos 10 días después de la exposición al tumor, se prepararon esplenocitos singénicos transducidos de forma simulada y transducidos con CAR anti-GD2. Los ratones de dividieron en la siguientes 4 cohortes: ratones con tumores CT26 que expresan GD2 que reciben esplenocitos con CAR anti-GD2, tumores CT26 que expresan GD2 que reciben esplenocitos con transducción simulada; tumores CT26 GD2 negativos (wt) con esplenocitos con CAR anti-GD2; y tumores CT26 que expresan GD2 que no reciben esplenocitos. El tumor se midió usando un calibre digital en 3 dimensiones y el volumen se estimó con ello. La figura 11 muestra las curvas de crecimiento de los tumores. Únicamente los tumores GD2 positivos en los ratones que recibieron linfocitos T con CAR anti-GD2 obtuvieron poco o ningún crecimiento.

Ejemplo 10 - Comparación de la función de los CAR que comprenden dominios de unión a antígeno basados en huK666 y 14g2a

EL dominio de unión a antígeno de un CAR puede afectar a su función. En este estudio, se comparó la función del CAR de la invención con un dominio de unión a antígeno basado en huK666 con un CAR que es con un CAR equivalente que tiene un dominio de unión a antígeno basado en 14g2a.

El anticuerpo 14g2a puede verse como el anticuerpo de tratamiento de referencia contra GD2 ya que se usa como un mAb terapéutico y es el único scFv ensayado en un estudio de CAR.

Se construyeron CAR de segunda generación y se expresaron basándose en huK666 o 14g2a. Su estructura se muestra en la figura 14a.

Se produjeron retrovirus por transfección transitoria de linfocitos 293T con plásmidos que codifican los CAR de GD2, gag/pol y la proteína de envuelta RD114. Después de 3 días, los sobrenadantes se recogieron y se usaron para transducir PBMC activadas con PHA/IL2 con valoraciones iguales de retrovirus en placas recubiertas con retronectina. Los CAR diferían únicamente en su dominio de unión a antígeno. En ambos casos, los dominios de

unión se ligaron a la membrana con un segmento Fc de IgG y contenían motivos activadores intracelulares de CD28 y CD3-zeta. Seis días después de la transducción se confirmó la expresión de CAR por citometría de flujo y se cultivaron las PBMC en una relación 1:1 con células Lan1 GD2 positivas (una línea celular GD2 positiva) o células A204 GD2 negativas (una línea celular de rhabdomyosarcoma GD2 negativa). Después de un día, se ensayaron los sobrenadantes de estos cocultivos para los niveles de interferón- γ por ELISA y se evaluó la proliferación de linfocitos T por citometría de flujo después de 6 días.

Los resultados se muestran en las figuras 14 y 15. A las 24 horas, se midió el interferón-gamma del sobrenadante. Se demostró que los linfocitos T con CAR huK666 producen más IFN- γ (figura 14b). Después de una semana, se contaron los linfocitos T y se demostró que el CAR huK666 tiene más proliferación (figura 14c).

Después de una semana de cocultivo con la línea celular de neuroblastoma LAN1, las células se recogieron y se analizaron por citometría de flujo. La expresión de CD45 permitió la discriminación de células linfoides y células no linfoides siendo las células CD45- células LAN-1. La tinción adicional con CD3/QBEND/10 permitió el recuento de los linfocitos T con CAR. Se descubrió que los linfocitos T con CAR huK666 proliferan mejor y eliminan más completamente que los equivalentes 14g2a (figura 15).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> UCL Business PLC

<120> RECEPTOR QUIMÉRICO DE ANTÍGENOS

<130> P103293PCT

<150> 1403972.1

<151> 06-03-2014

<160> 37

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR1 de la región variable de cadena pesada

<400> 1

Ser Tyr Asn Ile His
1 5

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR2 de la región variable de cadena pesada

<400> 2

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

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR3 de la región variable de cadena pesada

<400> 3

Arg Ser Asp Asp Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

5 <210> 4
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> CDR1 de la región variable de cadena ligera

<400> 4

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His
1 5 10

15 <210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> CDR2 de la región variable de cadena ligera

25 <400> 5

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

30 <210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> CDR3 de la región variable de cadena ligera

<400> 6

Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Pro Ile Thr
1 5

40 <210> 7
<211> 243
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Secuencia de KM666 murina

50 <400> 7

ES 2 673 123 T3

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

<210> 8
 <211> 242
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de KM666 humanizada

<400> 8

```

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1          5          10          15

Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ala Ser Tyr
          20          25          30

Asn Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
          35          40          45

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

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Phe Leu
65          70          75          80

Lys Met Ser Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
          85          90          95

Lys Arg Ser Asp Asp Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
          100          105          110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
          115          120          125

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asn Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
          130          135          140

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser
145          150          155          160

Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Lys
          165          170          175

Ala Pro Lys Val Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val
          180          185          190

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

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
210          215          220

Tyr Ser Gly Tyr Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
225          230          235          240

Lys Arg

```

<210> 9
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de VH (región variable de cadena pesada) de KM666 murina

<400> 9

10

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Ala Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ala Ser Tyr
 20 25 30

Asn Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

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

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80

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

Lys Arg Ser Asp Asp Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 10
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Secuencia de VH de KM666 humanizada

20

<400> 10

ES 2 673 123 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ala Ser Tyr
 20 25 30

Asn Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

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

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80

Lys Met Ser Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Lys Arg Ser Asp Asp Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 11

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de VL (región variable de cadena ligera) de KM666 murina

<400> 11

Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Ala Ser Pro Lys Val Trp
 35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu
 65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Pro
 85 90 95

Ile Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Val Lys
 100 105

ES 2 673 123 T3

<210> 12
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de VL de KM666 humanizada

<400> 12

10

Glu	Asn	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Ser	Ser
			20					25					30		
Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Val	Trp
		35					40					45			
Ile	Tyr	Ser	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser
	50					55					60				
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln
65					70					75					80
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Pro
				85					90					95	
Ile	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys				
			100					105							

<210> 13
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Dominio transmembranario

20

<400> 13

Phe	Trp	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu
1				5					10					15	
Leu	Val	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe	Trp	Val					
			20					25							

25

<210> 14
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Endodominio de CD28
 <400> 14

ES 2 673 123 T3

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr
35

<210> 15

<211> 38

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Endodominio de CD40

<400> 15

Arg Ser Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly
1 5 10 15

Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His
20 25 30

Ser Thr Leu Ala Lys Ile
35

<210> 16

<211> 114

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Endodominio de CD3 zeta

<400> 16

ES 2 673 123 T3

Arg	Ser	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	
1				5					10					15		
Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	
			20					25					30			
Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	
		35					40					45				
Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	
	50					55					60					
Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	
65					70					75					80	
Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	
				85					90					95		
Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	
				100					105						110	

Pro Arg

<210> 17
<211> 153
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CD28Z

<400> 17

ES 2 673 123 T3

```

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
1          5          10          15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
20          25          30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser
35          40          45

Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu
50          55          60

Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg
65          70          75          80

Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln
85          90          95

Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr
100         105         110

Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp
115         120         125

Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala
130         135         140

Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
145         150

```

<210> 18
 <211> 189
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CD28OXZ

<400> 18

ES 2 673 123 T3

```

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
1          5          10          15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
20          25          30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro
35          40          45

Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln
50          55          60

Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile Arg Val Lys
65          70          75          80

Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln
85          90          95

Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
100         105         110

Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg
115         120         125

Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met
130         135         140

Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly
145         150         155         160

Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp
165         170         175

Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
180         185

```

<210> 19
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido señal

<400> 19

```

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1          5          10          15

Gly Ser Thr Gly
20

```

<210> 20
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Espaciador de bisagra-CH2CH3 de IgG1 humana

<400> 20

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
          165          170          175

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

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

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp
225          230
    
```

10

5 <210> 21
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Espaciador de tallo de CD8 humana

 10 <400> 21

 Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
 1 5 10 15

 Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
 20 25 30

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

 15 <210> 22
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Espaciador de bisagra de IgG1 humana

 20 <400> 22

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

 Lys Asp Pro Lys
 20

 25 <210> 23
 <211> 237
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Espaciador de bisagra-Fc de IgG1

 <400> 23

ES 2 673 123 T3

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

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
165 170 175

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

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

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

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

<210> 24

<211> 236

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Espaciador de bisagra de IgG1 - Fc modificado para eliminar los motivos de reconocimiento de Fc

<400> 24

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165         170         175

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

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

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

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

```

<210> 25
 <211> 6014
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Casete retrovírico

<400> 25

10

tgaaagaccc	cacctgtagg	tttggcaagc	tagcttaagt	aacgccat	ttgcaaggcat	60
ggaaaaatac	ataactgaga	atagaaaagt	tcagatcaag	gtcaggaaca	gatggaacag	120
ctgaatatgg	gccaaacagg	atatctgtgg	taagcagttc	ctgccccggc	tcagggccaa	180
gaacagatgg	aacagctgaa	tatgggccaa	acaggatata	tgtggtaagc	agttcctgcc	240
ccggctcagg	gccagaaca	gatggtcccc	agatgcgggc	cagccctcag	cagtttctag	300
agaaccatca	gatgtttcca	gggtgcccc	aggacctgaa	atgacctgtg	gccttatttg	360
aactaaccaa	tcagttcgct	tctcgcttct	gttcgcgcgc	ttatgctccc	cgagctcaat	420
aaaagagccc	acaaccctc	actcggggcg	ccagtcctcc	gattgactga	gtcggccggg	480
taccctgtga	tccaataaac	cctcttgacg	ttgcatccga	cttgtggtct	cgctgttcct	540
tgggaggggc	tcctctgagt	gattgactac	ccgtcagcgg	gggtctttca	tttgggggct	600
cgtccgggat	cgggagaccc	ctgccagggg	accaccgacc	caccaccggg	aggtaagctg	660
gccagcaact	tatctgtgtc	tgtccgattg	tctagtgtct	atgactgatt	ttatgcgcct	720
gcgtcgggtac	tagttagcta	actagctctg	tatctggcgg	accctgtggtg	gaactgacga	780
gttcggaaca	ccgggccgca	accctgggag	acgtcccagg	gacttcgggg	gccgtttttg	840
tggcccgacc	tgagtcctaa	aatcccgatc	gtttaggact	ctttggtgca	cccccttag	900
aggagggata	tgtggttctg	gtaggagacg	agaacctaaa	acagttcccc	cctccgtctg	960
aatttttgct	ttcggtttgg	gaccgaagcc	gcgcgcgcgc	tcttgtctgc	tgcagcatcg	1020
ttctgtgttg	tctctgtctg	actgtgtttc	tgtatttgtc	tgaaaatatg	ggcccgggct	1080
agcctgttac	cactccctta	agtttgacct	taggtcactg	gaaagatgtc	gagcggatcg	1140
ctcacaacca	gtcggtagat	gtcaagaaga	gacgttgggt	taccttctgc	tctgcagaat	1200
ggccaacctt	taacgtcgga	tggccgcgag	acggcacctt	taaccgagac	ctcatcacc	1260
aggttaagat	caaggctctt	tcacctggcc	cgcatggaca	cccagaccag	gtgggggtaca	1320
tcgtgacctg	ggaagccttg	gcttttgacc	cccctccctg	ggtcaagccc	tttgtagacc	1380
ctaagcctcc	gcctcctctt	cctccatccg	ccccgtctct	cccccttgaa	cctcctcgtt	1440

ES 2 673 123 T3

cgaccccgcc	togatcctcc	ctttatccag	ccctcaactcc	ttctctaggc	gcccccatat	1500
ggccatatga	gatcttatat	ggggcacccc	cgccccttgt	aaacttcct	gaccctgaca	1560
tgacaagagt	tactaacagc	ccctctctcc	aagctcaact	acaggctctc	tacttagtcc	1620
agcacgaagt	ctggagacct	ctggcggcag	cctaccaaga	acaactggac	cgaccggtgg	1680
tacctcacc	ttaccgagtc	ggcgacacag	tgtgggtccg	ccgacaccag	actaagaacc	1740
tagaacctcg	ctggaaagga	ccttacacag	tctgtctgac	cacccccacc	gccctcaaag	1800
tagacggcat	cgcagcttgg	atacacgccg	cccacgtgaa	ggctgccgac	cccgggggtg	1860
gaccatcctc	tagactgcca	acatgggcac	cagcctgctg	tgctggatgg	ccctgtgcct	1920
gctgggcgcc	gaccacgccg	atgcctgccc	ctacagcaac	cccagcctgt	gcagcggagg	1980
cggcggcagc	gagctgcca	cccagggcac	cttctccaac	gtgtccacca	acgtgagccc	2040
agccaagccc	accaccaccg	cctgtcctta	ttccaatcct	tccctgtgta	gcggaggggg	2100
aggcagccca	gccccagac	ctcccacccc	agccccacc	atcgccagcc	agcctctgag	2160
cctgagaccc	gaggcctgcc	gccagccgc	cggcggcgcc	gtgcacacca	gaggcctgga	2220
tttcgcctgc	gatatctaca	tctgggcccc	actggccggc	acctgtggcg	tgctgctgct	2280
gagcctggtg	atcacctgt	actgcaacca	ccgcaaccgc	aggcgcgtgt	gcaagtgccc	2340
caggcccgtg	gtgagagccg	aggcagagg	cagcctgctg	acctgcggcg	acgtggagga	2400
gaaccagggc	cccatggaga	ccgacaccct	gctgctgtgg	gtgctgctgc	tgtgggtgcc	2460
aggcagcacc	ggccaggtgc	agctgcagga	gtctggccca	ggcctggtga	agcccagcca	2520
gaccctgagc	atcacctgca	ccgtgagcgg	cttcagcctg	gccagctaca	acatccactg	2580
ggtgcggcag	ccccagga	aggcctgga	gtggctgggc	gtgatctggg	ctggcggcag	2640
caccaactac	aacagcgccc	tgatgagccg	gctgaccatc	agcaaggaca	acagcaagaa	2700
ccaggtgttc	ctgaagatga	gcagcctgac	agccgcgcgac	accgccgtgt	actactgcgc	2760
caagcggagc	gacgactaca	gctggttcgc	ctactggggc	cagggcaccc	tggtgaccgt	2820
gagctctggc	ggaggcggct	ctggcggagg	cggctctggc	ggaggcggca	gcgagaacca	2880
gatgaccag	agccccagca	gcttgagcgc	cagcgtgggc	gaccgggtga	ccatgacctg	2940
cagagccagc	agcagcgtga	gcagcagcta	cctgcactgg	taccagcaga	agagcggcaa	3000
ggcccaaag	gtgtggatct	acagcaccag	caacctggcc	agcggcgtgc	ccagccggtt	3060
cagcggcagc	ggcagcggca	ccgactacac	cctgaccatc	agcagcctgc	agcccagga	3120
cttcgccacc	tactactgcc	agcagtacag	cggctacccc	atcaccttcg	gccagggcac	3180
caaggtggag	atcaagcggg	cggatcccg	cagacccaaa	tctcctgaca	aaactcacac	3240
atgccaccg	tgcccagcac	ctcccgtggc	cggcccgta	gtcttcctct	tcccccaaaa	3300
acccaaggac	accctcatga	tcgcccggac	ccctgaggtc	acatgcgtgg	tgggtggacgt	3360

gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa	3420
tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct	3480
caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa	3540
agccctccca gcccccatcg agaaaacat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc	3600
acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac	3660
ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca	3720
accggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttct	3780
ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc	3840
cgtgatgcat gaggccctgc acaatcacta taccagaaa tctctgagtc tgagcccagg	3900
caagaaggac cccaagttct gggtcctggg ggtggtggga ggctgctgg cctgttactc	3960
tctcctgggtg accgtggcct tcatcatctt ctgggtgcgc tccaagagga gcaggctcct	4020
gcacagtgac tacatgaaca tgactccccg ccgccccggg cccacccgca agcattacca	4080
gccctatgcc ccaccacgcg acttcgcagc ctatcgctcc cgggtgaagt tctctcgctc	4140
tgccgatgcc ccagcctatc agcagggcca gaatcagctg tacaatgaac tgaacctggg	4200
caggcgggag gagtacgacg tgctggataa gcggagaggc agagaccccg agatgggcgg	4260
caaaccacgg cgcaaaaaatc cccaggaggg actctataac gagctgcaga aggacaaaat	4320
ggccgaggcc tattccgaga tcggcatgaa gggagagaga agacgcggaa agggccacga	4380
cggcctgtat cagggattgt ccaccgctac aaaagatata tatgatgcc tgcacatgca	4440
ggccctgcc cccagatgac gcgtatcgat actgttctca tcacatcata tcaaggttat	4500
ataccatcaa tattgccaca gatgttactt agccttttaa ttttctcta atttagtgta	4560
tatgcaatga tagttctctg atttctgaga ttgagtttct catgtgtaat gattatttag	4620
agtttctctt tcatctgttc aaatttttgt ctagttttat ttttactga tttgtaagac	4680
ttctttttat aatctgcata ttacaattct ctttactggg gtgttgcaaa tattttctgt	4740
cattctatgg cctgactttt cttaatggtt ttttaatttt aaaaataagt cttaatatcc	4800
atgcaatcta attacaatc ttttctttgt ggttaggact ttgagtcata agaaattttt	4860
ctctacactg aagtcatgat ggcatgcttc tatattattt tctaaaagat ttaaagtttt	4920
gccttctcca tttagactta taattcactg gaattttttt gtgtgtatgg tatgacatat	4980
gggttccctt ttatttttta catataaata tatttccctg tttttctaaa aaagaaaaag	5040
atcatcattt tccattgta aaatgccata tttttttcat aggtcactta catatatcaa	5100
tgggtctgtt tctgagctct actctatttt atcagcctca ctgtctatcc ccacacatct	5160
catgctttgc tctaaatctt gatatttagt ggaacattct ttccattttt gttctacaag	5220

ES 2 673 123 T3

```

aatatTTTTg ttattgtctt tgggctttct atatacattt tgaaatgagg ttgacaagtt      5280
cggattagtc caatttgtaa aagacaggat atcagtgggc caggctctag ttttgactca      5340
acaatatcac cagctgaagc ctatagagta cgagccatag ataaaataaa agattttatt      5400
tagtctccag aaaaaggggg gaatgaaaga cccacactgt aggtttggca agctagctta      5460
agtaacgcca ttttgcaagg catggaaaaa tacataactg agaatagaga agttcagatc      5520
aaggtcagga acagatggaa cagctgaata tgggccaaac aggatatctg tggttaagcag      5580
ttcctgcccc ggctcagggc caagaacaga tggaacagct gaatatgggc caaacaggat      5640
atctgtggtg agcagttcct gccccgggctc agggccaaga acagatgggc ccagatgctg      5700
gtccagccct cagcagtttc tagagaacca tcagatgttt ccagggtgcc ccaaggacct      5760
gaaatgaccc tgtgccttat ttgaactaac caatcagttc gcttctcgct tctgttcgctg      5820
cgcttctgct ccccgagctc aataaaagag cccacaaccc ctcaactcggg gcgccagtcc      5880
tccgattgac tgagtcgccc gggtagccgt gtatccaata aaccctcttg cagttgcatc      5940
cgacttgtgg tctcgctggt ccttgggagg gtctcctctg agtgattgac taccgctcag      6000
cgggggtctt tcac                                                         6014

```

<210> 26
 <211> 719
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CAR anti-GD2, muKM666-HCH2CH3-CD28OXZ

<400> 26

```

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1          5          10          15

Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val
20          25          30

Ala Pro Ser Gln Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser
35          40          45

Leu Ala Ser Tyr Asn Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly
50          55          60

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

Ser Ala Leu Met Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser
85          90          95

```

ES 2 673 123 T3

Gln	Val	Phe	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Thr	Asp	Asp	Thr	Ala	Met
			100					105					110		
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Arg	Ser	Asp	Asp	Tyr	Ser	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp
		115					120					125			
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
	130					135					140				
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Asn	Val	Leu	Thr	Gln
145					150					155					160
Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr
				165					170					175	
Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Gln
			180					185					190		
Gln	Lys	Ser	Gly	Ala	Ser	Pro	Lys	Val	Trp	Ile	Tyr	Ser	Thr	Ser	Asn
		195					200					205			
Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Gly	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr
	210					215					220				
Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr
225					230					235					240
Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Pro	Ile	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly
			245						250					255	
Thr	Lys	Val	Glu	Val	Lys	Arg	Ser	Asp	Pro	Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Pro
			260					265					270		
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly
		275					280					285			
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
						295					300				
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
305					310					315					320
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
				325					330					335	
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
			340					345					350		

ES 2 673 123 T3

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	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	370	375	380
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	385	390	395
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	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	Lys	Leu	Thr	Val	450	455	460
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	465	470	475
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	485	490	495
Pro	Gly	Lys	Lys	Asp	Pro	Lys	Phe	Trp	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	500	505	510
Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe	515	520	525
Trp	Val	Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	Leu	Leu	His	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn	530	535	540
Met	Thr	Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Pro	Thr	Arg	Lys	His	Tyr	Gln	Pro	Tyr	545	550	555
Ala	Pro	Pro	Arg	Asp	Phe	Ala	Ala	Tyr	Arg	Ser	Arg	Asp	Gln	Arg	Leu	565	570	575
Pro	Pro	Asp	Ala	His	Lys	Pro	Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	Phe	Arg	Thr	Pro	580	585	590
Ile	Gln	Glu	Glu	Gln	Ala	Asp	Ala	His	Ser	Thr	Leu	Ala	Lys	Ile	Arg	595	600	605

ES 2 673 123 T3

Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln
610 615 620

Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp
625 630 635 640

Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro
645 650 655

Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp
660 665 670

Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg
675 680 685

Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr
690 695 700

Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
705 710 715

<210> 27

<211> 718

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CAR anti-GD2, huKM666-HCH2CH3-CD28OXZ

<400> 27

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
20 25 30

Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser
35 40 45

Leu Ala Ser Tyr Asn Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly
50 55 60

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

Ser Ala Leu Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

ES 2 673 123 T3

Gln Val Phe Leu Lys Met Ser Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Lys Arg Ser Asp Asp Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr Trp
 115 120 125
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asn Gln Met Thr Gln Ser
 145 150 155 160
 Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Met Thr Cys
 165 170 175
 Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln
 180 185 190
 Lys Ser Gly Lys Ala Pro Lys Val Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu
 195 200 205
 Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 210 215 220
 Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
 225 230 235 240
 Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr
 245 250 255
 Lys Val Glu Ile Lys Arg Ser Asp Pro Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp
 260 265 270
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 275 280 285
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 290 295 300
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 305 310 315 320
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 325 330 335
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 340 345 350

ES 2 673 123 T3

Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
		355					360					365			
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu
	370					375					380				
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr
385					390					395					400
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
				405					410					415	
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp
			420					425					430		
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val
		435					440					445			
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp
	450					455					460				
Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His
465					470					475					480
Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro
				485					490					495	
Gly	Lys	Lys	Asp	Pro	Lys	Phe	Trp	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val
			500					505					510		
Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe	Trp
		515					520					525			
Val	Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	Leu	Leu	His	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn	Met
	530					535					540				
Thr	Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Pro	Thr	Arg	Lys	His	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Ala
545					550					555					560
Pro	Pro	Arg	Asp	Phe	Ala	Ala	Tyr	Arg	Ser	Arg	Asp	Gln	Arg	Leu	Pro
				565					570					575	
Pro	Asp	Ala	His	Lys	Pro	Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	Phe	Arg	Thr	Pro	Ile
			580					585					590		
Gln	Glu	Glu	Gln	Ala	Asp	Ala	His	Ser	Thr	Leu	Ala	Lys	Ile	Arg	Val

ES 2 673 123 T3

595		600		605
Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn				
610		615		620
Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val				
625		630		640
Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg				
		645		650
Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys				
		660		665
Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg				
		675		680
Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys				
		690		695
Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg				
705		710		715

<210> 28

<211> 717

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CAR anti-GD2, huKM666-HCH2CH3pvaa-CD28OXZ

<400> 28

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15
Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
20 25 30
Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser
35 40 45
Leu Ala Ser Tyr Asn Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly
50 55 60
Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn
65 70 75 80
Ser Ala Leu Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

ES 2 673 123 T3

Gln	Val	Phe	Leu	Lys	Met	Ser	Ser	Leu	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	
			100						105							
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Arg	Ser	Asp	Asp	Tyr	Ser	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	
			115						120							
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	
			130						135							
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Asn	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	
			145						150							
Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Cys	
			165						170							
Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	
			180						185							
Lys	Ser	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Val	Trp	Ile	Tyr	Ser	Thr	Ser	Asn	Leu	
			195						200							
Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	
			210						215							
Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	
			225						230							
Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Pro	Ile	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	
			245						250							
Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Ser	Asp	Pro	Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Pro	Asp	
			260						265							
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	
			275						280							
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ala	
			290						295							
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	
			305						310							
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	
			325						330							
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	

ES 2 673 123 T3

				340						345						350			
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu				
		355					360					365							
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys				
	370					375					380								
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr				
385					390					395					400				
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr				
				405					410					415					
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu				
			420					425					430						
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu				
		435					440					445							
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys				
	450					455					460								
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu				
465					470					475					480				
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly				
				485					490					495					
Lys	Lys	Asp	Pro	Lys	Phe	Trp	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val	Leu				
			500					505					510						
Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe	Trp	Val				
		515					520					525							
Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	Leu	Leu	His	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn	Met	Thr				
	530					535					540								
Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Pro	Thr	Arg	Lys	His	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Ala	Pro				
545					550					555					560				
Pro	Arg	Asp	Phe	Ala	Ala	Tyr	Arg	Ser	Arg	Asp	Gln	Arg	Leu	Pro	Pro				
				565					570					575					
Asp	Ala	His	Lys	Pro	Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	Phe	Arg	Thr	Pro	Ile	Gln				
			580					585					590						

ES 2 673 123 T3

Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile Arg Val Lys
595 600 605

Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln
610 615 620

Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
625 630 635 640

Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg
645 650 655

Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met
660 665 670

Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly
675 680 685

Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp
690 695 700

Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
705 710 715

<210> 29

<211> 527

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CAR anti-GD2, huKM666-HSTK-CD28OXZ

<400> 29

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
20 25 30

Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser
35 40 45

Leu Ala Ser Tyr Asn Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly
50 55 60

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

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

ES 2 673 123 T3

85								90				95			
Gln	Val	Phe	Leu	Lys	Met	Ser	Ser	Leu	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val
			100					105					110		
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Arg	Ser	Asp	Asp	Tyr	Ser	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp
		115					120					125			
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
	130					135					140				
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Asn	Gln	Met	Thr	Gln	Ser
145					150					155					160
Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Cys
				165					170					175	
Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln
			180					185					190		
Lys	Ser	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Val	Trp	Ile	Tyr	Ser	Thr	Ser	Asn	Leu
		195					200					205			
Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp
		210				215					220				
Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr
225					230					235					240
Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Pro	Ile	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr
				245					250					255	
Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Ser	Asp	Pro	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg
			260					265					270		
Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg
		275					280					285			
Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly
	290					295					300				
Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Phe	Trp	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly
305					310					315					320
Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe
				325					330					335	

ES 2 673 123 T3

Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn
340 345 350

Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr
355 360 365

Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Asp Gln Arg Leu
370 375 380

Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro
385 390 395 400

Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile Arg
405 410 415

Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln
420 425 430

Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp
435 440 445

Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro
450 455 460

Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp
465 470 475 480

Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg
485 490 495

Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr
500 505 510

Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
515 520 525

<210> 30

<211> 527

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CAR anti-GD2, huKM666-STK-CD28XOXZ

<400> 30

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val

ES 2 673 123 T3

20					25					30					
Lys	Pro	Ser	Gln	Thr	Leu	Ser	Ile	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser
		35					40					45			
Leu	Ala	Ser	Tyr	Asn	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly
	50					55					60				
Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Val	Ile	Trp	Ala	Gly	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn
65					70					75					80
Ser	Ala	Leu	Met	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn
				85					90					95	
Gln	Val	Phe	Leu	Lys	Met	Ser	Ser	Leu	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val
			100					105					110		
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Arg	Ser	Asp	Asp	Tyr	Ser	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp
		115					120					125			
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
	130					135					140				
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Asn	Gln	Met	Thr	Gln	Ser
145					150					155					160
Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Cys
				165					170					175	
Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln
			180					185					190		
Lys	Ser	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Val	Trp	Ile	Tyr	Ser	Thr	Ser	Asn	Leu
		195					200					205			
Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp
	210					215					220				
Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr
225					230					235					240
Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Pro	Ile	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr
				245					250					255	
Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Ser	Asp	Pro	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg
			260					265					270		

ES 2 673 123 T3

Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	275	280	285
Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	290	295	300
Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Phe	Trp	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	305	310	315
Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe	325	330	335
Trp	Val	Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	Leu	Leu	His	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn	340	345	350
Met	Thr	Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Pro	Thr	Arg	Lys	His	Tyr	Gln	Pro	Tyr	355	360	365
Ala	Pro	Pro	Arg	Asp	Phe	Ala	Ala	Tyr	Arg	Ser	Arg	Asp	Gln	Arg	Leu	370	375	380
Pro	Pro	Asp	Ala	His	Lys	Pro	Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	Phe	Arg	Thr	Pro	385	390	395
Ile	Gln	Glu	Glu	Gln	Ala	Asp	Ala	His	Ser	Thr	Leu	Ala	Lys	Ile	Arg	405	410	415
Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	420	425	430
Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	435	440	445
Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	450	455	460
Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	465	470	475
Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	485	490	495
Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	500	505	510
Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg		515	520	525

ES 2 673 123 T3

<210> 31
 <211> 501
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CAR anti-GD2, huKM666-HNG-CD28OXZ

<400> 31

```

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1          5          10          15

Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
20          25          30

Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser
35          40          45

Leu Ala Ser Tyr Asn Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly
50          55          60

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

Ser Ala Leu Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn
85          90          95

Gln Val Phe Leu Lys Met Ser Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
100         105         110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Arg Ser Asp Asp Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr Trp
115        120        125

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asn Gln Met Thr Gln Ser
145        150        155        160

Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Met Thr Cys
165        170        175

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln
180        185        190

Lys Ser Gly Lys Ala Pro Lys Val Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu
195        200        205
  
```

ES 2 673 123 T3

Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	210	215	220
Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	225	230	235
Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Pro	Ile	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	245	250	255
Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Ser	Asp	Pro	Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Pro	Asp	260	265	270
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Lys	Asp	Pro	Lys	Phe	Trp	Val	275	280	285
Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	Thr	290	295	300
Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe	Trp	Val	Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	Leu	Leu	305	310	315
His	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn	Met	Thr	Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Pro	Thr	Arg	325	330	335
Lys	His	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Ala	Pro	Pro	Arg	Asp	Phe	Ala	Ala	Tyr	Arg	340	345	350
Ser	Arg	Asp	Gln	Arg	Leu	Pro	Pro	Asp	Ala	His	Lys	Pro	Pro	Gly	Gly	355	360	365
Gly	Ser	Phe	Arg	Thr	Pro	Ile	Gln	Glu	Glu	Gln	Ala	Asp	Ala	His	Ser	370	375	380
Thr	Leu	Ala	Lys	Ile	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	385	390	395
Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	405	410	415
Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	420	425	430
Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	435	440	445
Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	450	455	460

Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln
465 470 475 480

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

Ala Leu Pro Pro Arg
500

<210> 32

<211> 642

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CAR anti-GD2, huKM666-HCH2CH3pvaa-CD28tmZ

<400> 32

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
20 25 30

Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser
35 40 45

Leu Ala Ser Tyr Asn Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly
50 55 60

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

Ser Ala Leu Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

Gln Val Phe Leu Lys Met Ser Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Arg Ser Asp Asp Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr Trp
115 120 125

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asn Gln Met Thr Gln Ser
145 150 155 160

ES 2 673 123 T3

Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Cys	165	170	175	
Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	180	185	190	
Lys	Ser	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Val	Trp	Ile	Tyr	Ser	Thr	Ser	Asn	Leu	195	200	205	
Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	210	215	220	
Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	225	230	235	240
Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Pro	Ile	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	245	250	255	
Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Ser	Asp	Pro	Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Pro	Asp	260	265	270	
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	275	280	285	
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ala	290	295	300	
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	305	310	315	320
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	325	330	335	
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	340	345	350	
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	355	360	365	
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	370	375	380	
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	385	390	395	400
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	405	410	415	

ES 2 673 123 T3

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
420 425 430

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
435 440 445

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
450 455 460

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
465 470 475 480

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
485 490 495

Lys Lys Asp Pro Lys Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu
500 505 510

Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
515 520 525

Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln
530 535 540

Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu
545 550 555 560

Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly
565 570 575

Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu
580 585 590

Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly
595 600 605

Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser
610 615 620

Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro
625 630 635 640

Pro Arg

<210> 33
<211> 681
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CAR anti-GD2, huMK666-HCH2CH3pvaa-CD28Z

<400> 33

5

```

Met  Glu  Thr  Asp  Thr  Leu  Leu  Leu  Trp  Val  Leu  Leu  Leu  Trp  Val  Pro
 1          5          10          15

Gly  Ser  Thr  Gly  Gln  Val  Gln  Leu  Gln  Glu  Ser  Gly  Pro  Gly  Leu  Val
          20          25          30

Lys  Pro  Ser  Gln  Thr  Leu  Ser  Ile  Thr  Cys  Thr  Val  Ser  Gly  Phe  Ser
          35          40          45

Leu  Ala  Ser  Tyr  Asn  Ile  His  Trp  Val  Arg  Gln  Pro  Pro  Gly  Lys  Gly
 50          55          60

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

Ser  Ala  Leu  Met  Ser  Arg  Leu  Thr  Ile  Ser  Lys  Asp  Asn  Ser  Lys  Asn
          85          90          95

Gln  Val  Phe  Leu  Lys  Met  Ser  Ser  Leu  Thr  Ala  Ala  Asp  Thr  Ala  Val
          100          105          110

Tyr  Tyr  Cys  Ala  Lys  Arg  Ser  Asp  Asp  Tyr  Ser  Trp  Phe  Ala  Tyr  Trp
          115          120          125

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

Gly  Gly  Gly  Ser  Gly  Gly  Gly  Gly  Ser  Glu  Asn  Gln  Met  Thr  Gln  Ser
145          150          155          160

Pro  Ser  Ser  Leu  Ser  Ala  Ser  Val  Gly  Asp  Arg  Val  Thr  Met  Thr  Cys
          165          170          175

Arg  Ala  Ser  Ser  Ser  Val  Ser  Ser  Ser  Tyr  Leu  His  Trp  Tyr  Gln  Gln
          180          185          190

Lys  Ser  Gly  Lys  Ala  Pro  Lys  Val  Trp  Ile  Tyr  Ser  Thr  Ser  Asn  Leu
          195          200          205

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

```

ES 2 673 123 T3

Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	225	230	235	240
Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Pro	Ile	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	245	250	255	
Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Ser	Asp	Pro	Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Pro	Asp	260	265	270	
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	275	280	285	
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ala	290	295	300	
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	305	310	315	320
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	325	330	335	
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	340	345	350	
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	355	360	365	
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	370	375	380	
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	385	390	395	400
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	405	410	415	
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	420	425	430	
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	435	440	445	
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	450	455	460	
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	465	470	475	480

ES 2 673 123 T3

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
485 490 495

Lys Lys Asp Pro Lys Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu
500 505 510

Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
515 520 525

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
530 535 540

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
545 550 555 560

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser 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
675 680

<210> 34

<211> 1103

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CAR anti-GD2 coexpresado con el gen suicida iCasp9

<400> 34

ES 2 673 123 T3

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

ES 2 673 123 T3

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

ES 2 673 123 T3

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

ES 2 673 123 T3

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

ES 2 673 123 T3

Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
1010 1015 1020

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly
1025 1030 1035

Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu
1040 1045 1050

Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys
1055 1060 1065

Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
1070 1075 1080

Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln
1085 1090 1095

Ala Leu Pro Pro Arg
1100

<210> 35

<211> 858

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CAR anti-GD2 coexpresado con el gen suicida RQR8

<400> 35

Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala
1 5 10 15

Asp His Ala Asp Ala Cys Pro Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly
20 25 30

Gly Gly Gly Ser Glu Leu Pro Thr Gln Gly Thr Phe Ser Asn Val Ser
35 40 45

Thr Asn Val Ser Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Ala Cys Pro Tyr Ser
50 55 60

Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Ala Pro Arg Pro
65 70 75 80

Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro
85 90 95

ES 2 673 123 T3

Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	100	105	110
Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	115	120	125
Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Asn	His	Arg	130	135	140
Asn	Arg	Arg	Arg	Val	Cys	Lys	Cys	Pro	Arg	Pro	Val	Val	Arg	Ala	Glu	145	150	155
Gly	Arg	Gly	Ser	Leu	Leu	Thr	Cys	Gly	Asp	Val	Glu	Glu	Asn	Pro	Gly	165	170	175
Pro	Met	Glu	Thr	Asp	Thr	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	180	185	190
Pro	Gly	Ser	Thr	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	195	200	205
Val	Lys	Pro	Ser	Gln	Thr	Leu	Ser	Ile	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	210	215	220
Ser	Leu	Ala	Ser	Tyr	Asn	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	225	230	235
Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Val	Ile	Trp	Ala	Gly	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	245	250	255
Asn	Ser	Ala	Leu	Met	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	260	265	270
Asn	Gln	Val	Phe	Leu	Lys	Met	Ser	Ser	Leu	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	275	280	285
Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Arg	Ser	Asp	Asp	Tyr	Ser	Trp	Phe	Ala	Tyr	290	295	300
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	305	310	315
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Asn	Gln	Met	Thr	Gln	325	330	335
Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Met	Thr	340	345	350

ES 2 673 123 T3

Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	355	360	365	
Gln	Lys	Ser	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Val	Trp	Ile	Tyr	Ser	Thr	Ser	Asn	370	375	380	
Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	385	390	395	400
Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	405	410	415	
Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Pro	Ile	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	420	425	430	
Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Ser	Asp	Pro	Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Pro	435	440	445	
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	450	455	460	
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	465	470	475	480
Ala	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	485	490	495	
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	500	505	510	
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	515	520	525	
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	530	535	540	
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	545	550	555	560
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	565	570	575	
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	580	585	590	
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	595	600	605	

ES 2 673 123 T3

Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val
610						615					620				
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp
625					630					635					640
Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His
				645					650					655	
Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro
			660					665					670		
Gly	Lys	Lys	Asp	Pro	Lys	Phe	Trp	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val
		675					680					685			
Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe	Trp
690						695					700				
Val	Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	Leu	Leu	His	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn	Met
705					710					715					720
Thr	Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Pro	Thr	Arg	Lys	His	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Ala
				725					730					735	
Pro	Pro	Arg	Asp	Phe	Ala	Ala	Tyr	Arg	Ser	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg
			740					745					750		
Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn
		755					760					765			
Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg
770						775					780				
Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro
785					790					795					800
Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala
				805					810					815	
Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His
			820					825					830		
Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp
		835					840					845			
Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg						

850

855

<210> 36
 <211> 402
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de Caspasa 9 inducible (iCasp9)

<400> 36

```

Met Leu Glu Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg
1          5          10          15

Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly Met
          20          25          30

Leu Glu Asp Gly Lys Lys Val Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro
          35          40          45

Phe Lys Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu Glu
          50          55          60

Gly Val Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser
65          70          75          80

Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro Pro
          85          90          95

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

Gly Gly Ser Gly Val Asp Gly Phe Gly Asp Val Gly Ala Leu Glu Ser
          115          120          125

Leu Arg Gly Asn Ala Asp Leu Ala Tyr Ile Leu Ser Met Glu Pro Cys
          130          135          140

Gly His Cys Leu Ile Ile Asn Asn Val Asn Phe Cys Arg Glu Ser Gly
145          150          155          160

Leu Arg Thr Arg Thr Gly Ser Asn Ile Asp Cys Glu Lys Leu Arg Arg
          165          170          175

Arg Phe Ser Ser Leu His Phe Met Val Glu Val Lys Gly Asp Leu Thr
          180          185          190

Ala Lys Lys Met Val Leu Ala Leu Leu Glu Leu Ala Gln Gln Asp His
          195          200          205
    
```

ES 2 673 123 T3

Gly Ala Leu Asp Cys Cys Val Val Val Ile Leu Ser His Gly Cys Gln
 210 215 220

Ala Ser His Leu Gln Phe Pro Gly Ala Val Tyr Gly Thr Asp Gly Cys
 225 230 235 240

Pro Val Ser Val Glu Lys Ile Val Asn Ile Phe Asn Gly Thr Ser Cys
 245 250 255

Pro Ser Leu Gly Gly Lys Pro Lys Leu Phe Phe Ile Gln Ala Cys Gly
 260 265 270

Gly Glu Gln Lys Asp His Gly Phe Glu Val Ala Ser Thr Ser Pro Glu
 275 280 285

Asp Glu Ser Pro Gly Ser Asn Pro Glu Pro Asp Ala Thr Pro Phe Gln
 290 295 300

Glu Gly Leu Arg Thr Phe Asp Gln Leu Asp Ala Ile Ser Ser Leu Pro
 305 310 315 320

Thr Pro Ser Asp Ile Phe Val Ser Tyr Ser Thr Phe Pro Gly Phe Val
 325 330 335

Ser Trp Arg Asp Pro Lys Ser Gly Ser Trp Tyr Val Glu Thr Leu Asp
 340 345 350

Asp Ile Phe Glu Gln Trp Ala His Ser Glu Asp Leu Gln Ser Leu Leu
 355 360 365

Leu Arg Val Ala Asn Ala Val Ser Val Lys Gly Ile Tyr Lys Gln Met
 370 375 380

Pro Gly Cys Phe Asn Phe Leu Arg Lys Lys Leu Phe Phe Lys Thr Ser
 385 390 395 400

Ala Ser

<210> 37

<211> 157

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia del gen marcador/suicida RQR8 novedoso

<400> 37

ES 2 673 123 T3

Met	Gly	Thr	Ser	Leu	Leu	Cys	Trp	Met	Ala	Leu	Cys	Leu	Leu	Gly	Ala
1				5					10					15	
Asp	His	Ala	Asp	Ala	Cys	Pro	Tyr	Ser	Asn	Pro	Ser	Leu	Cys	Ser	Gly
			20					25					30		
Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Leu	Pro	Thr	Gln	Gly	Thr	Phe	Ser	Asn	Val	Ser
		35					40					45			
Thr	Asn	Val	Ser	Pro	Ala	Lys	Pro	Thr	Thr	Thr	Ala	Cys	Pro	Tyr	Ser
	50					55					60				
Asn	Pro	Ser	Leu	Cys	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro
65				70						75					80
Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro
				85					90					95	
Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu
			100					105					110		
Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys
		115					120					125			
Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Asn	His	Arg
	130					135					140				
Asn	Arg	Arg	Arg	Val	Cys	Lys	Cys	Pro	Arg	Pro	Val	Val			
145					150					155					

REIVINDICACIONES

1. Un receptor quimérico de antígenos (CAR) que comprende un dominio de unión a disialogangliósido (GD2) que comprende
 - a) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende un dominio VH que tiene la secuencia mostrada como la SEQ ID NO 10; y
 - b) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende un dominio VL que tiene la secuencia mostrada como la SEQ ID NO 12.
2. Un CAR de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el dominio de unión a GD2 comprende la secuencia mostrada como la SEQ ID NO 8.
3. Un CAR de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que comprende la secuencia mostrada como cualquiera de las SEQ ID NO 27 a 35 o una variante de las mismas que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia, pero retiene la capacidad de i) unirse a GD2 y ii) inducir señalización de linfocitos T.
4. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR de acuerdo con cualquier reivindicación precedente.
5. Una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende la secuencia mostrada como la SEQ ID NO 25 o una variante de la misma que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia.
6. Un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, que también codifica un gen suicida.
7. Un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6.
8. Una célula que expresa un CAR de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
9. Una célula que coexpresa un CAR de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un gen suicida.
10. Una célula de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el gen suicida es iCasp9 o RQR8.
11. Un método para generar una célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, que comprende la etapa de introducir un ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 ex vivo en una célula.
12. Una composición farmacéutica que comprende un vector de acuerdo con la reivindicación 7, o una célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, junto con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
13. Un vector de acuerdo con la reivindicación 7 o una célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 para su uso en el tratamiento de un cáncer.
14. Una célula para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el cáncer es neuroblastoma.

FIGURA 1

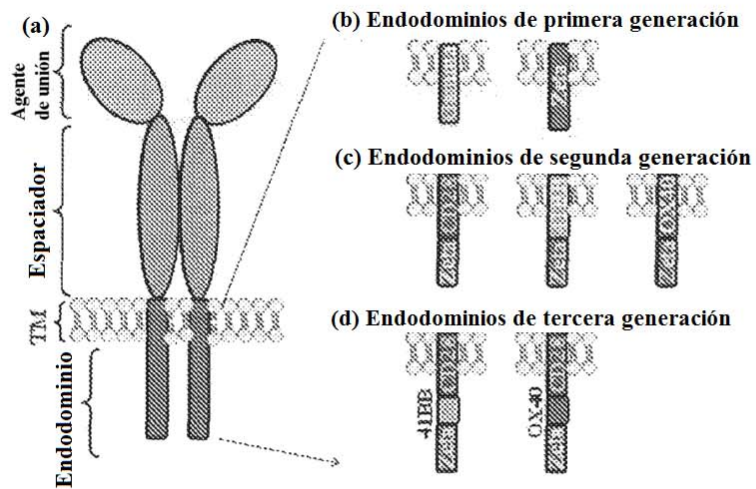


FIGURA 2

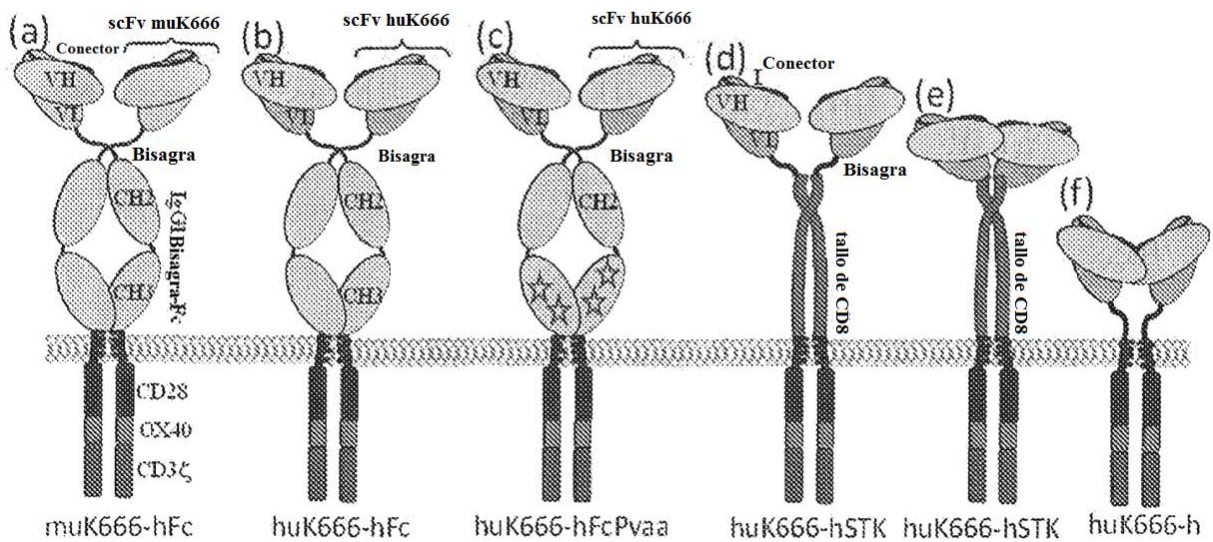


FIGURA 3

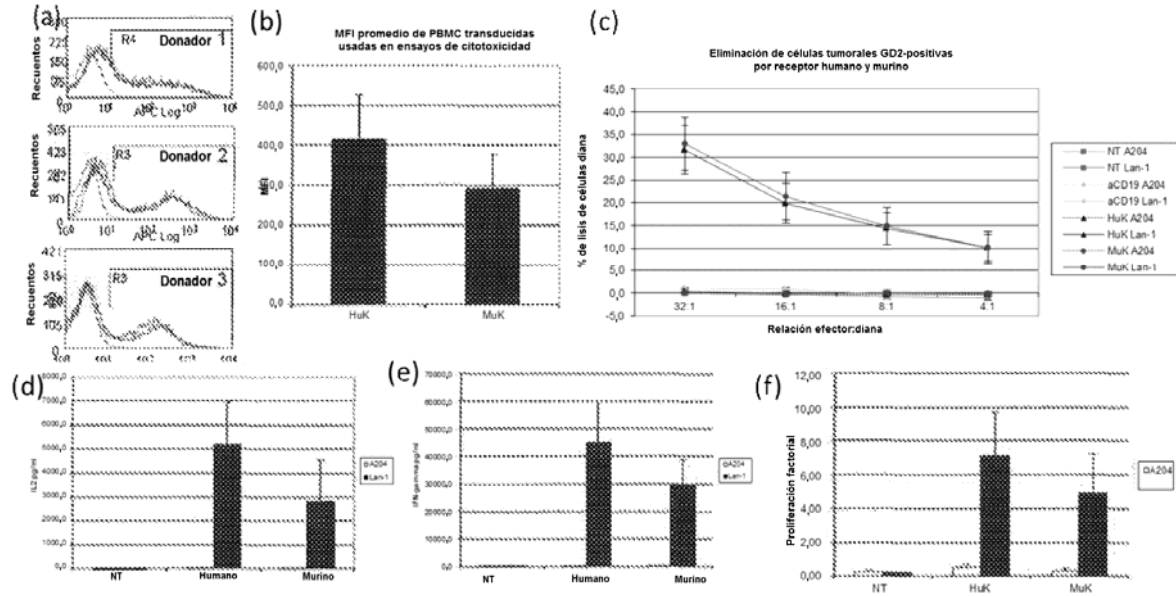


FIGURA 4

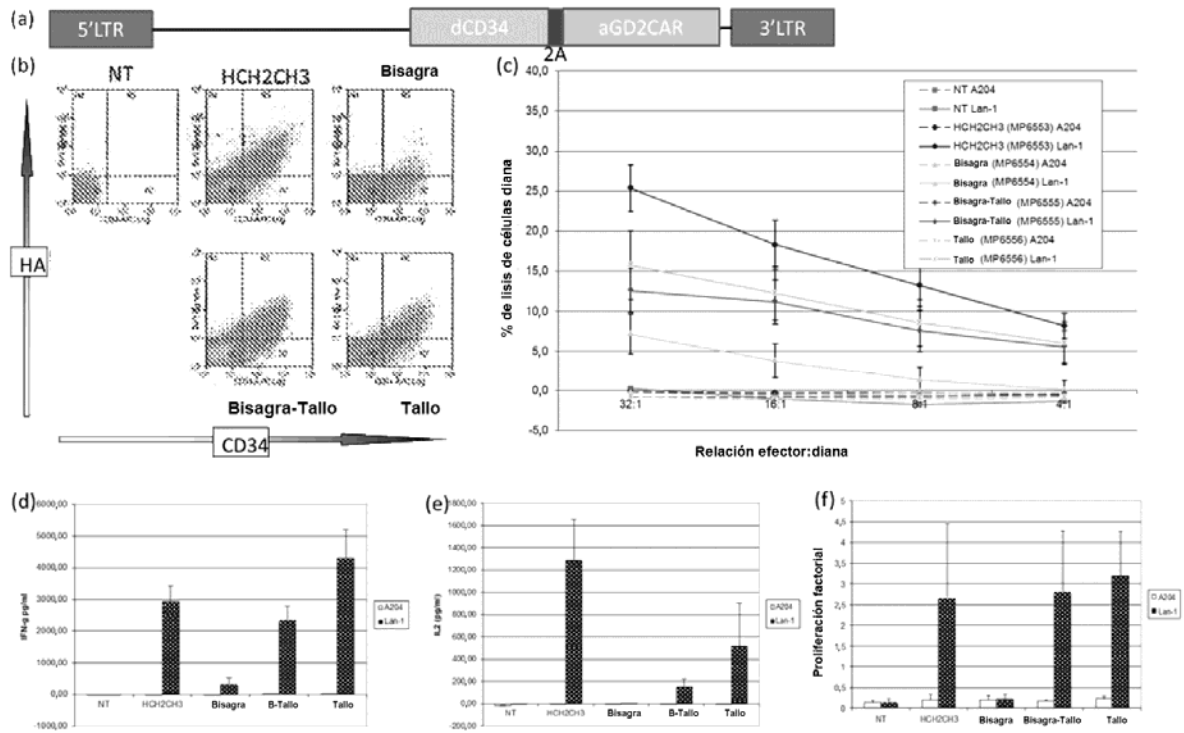


FIGURA 5

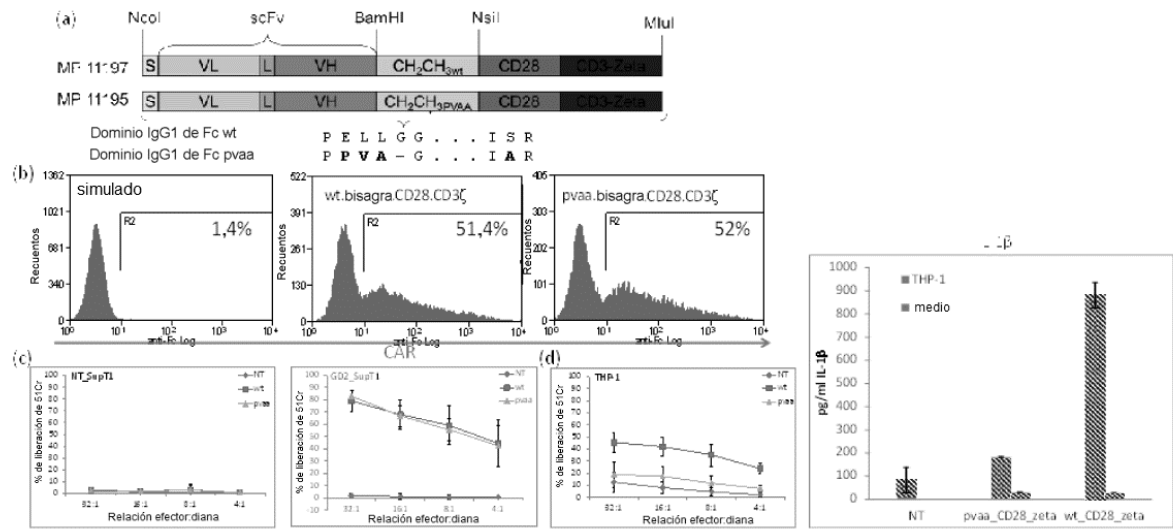


FIGURA 6

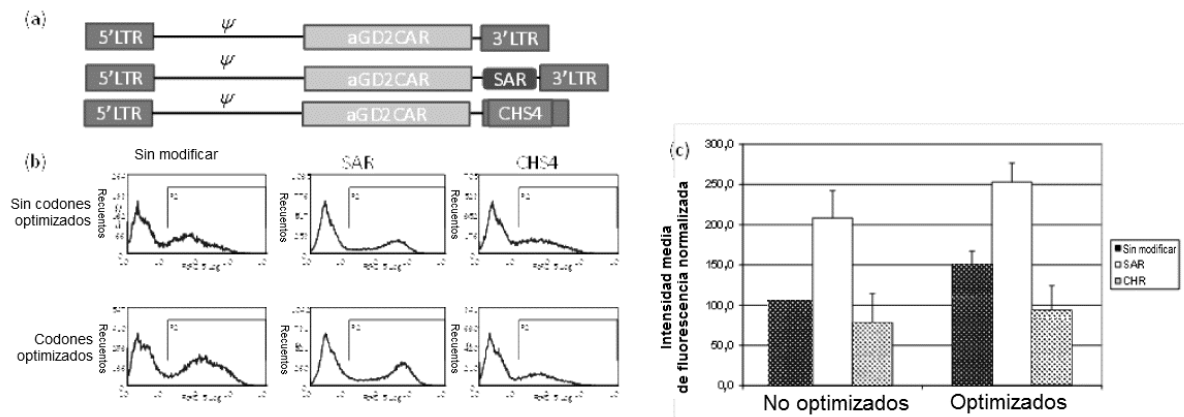


FIGURA 7

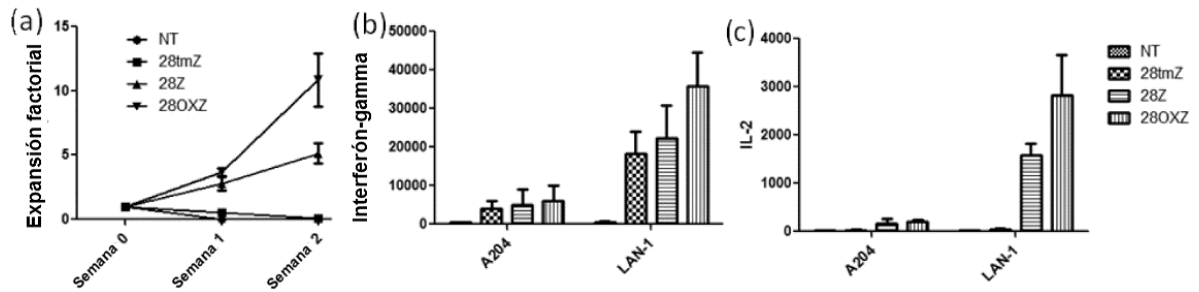


FIGURA 8

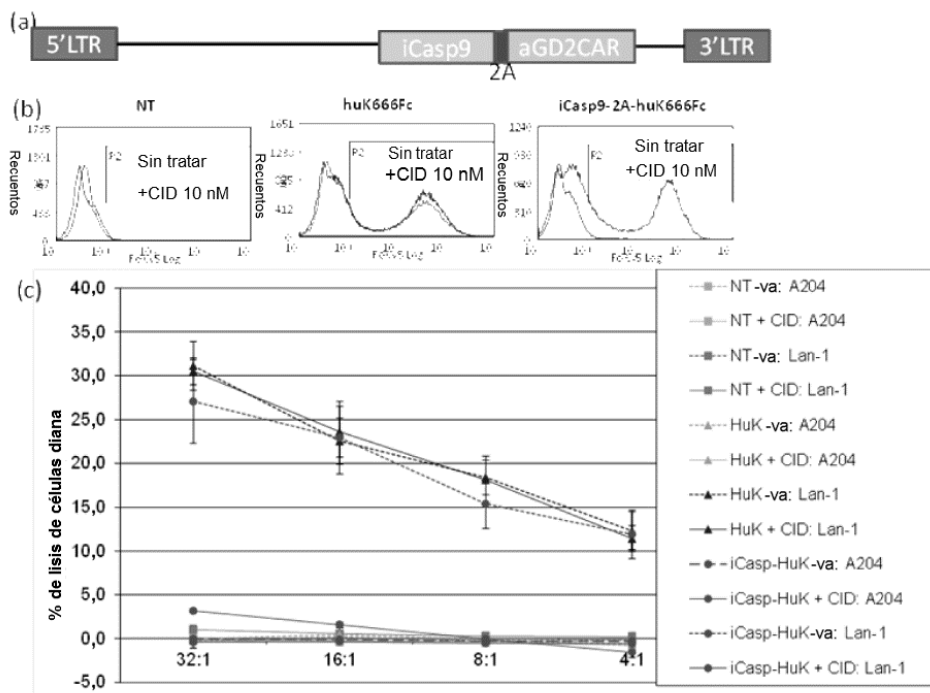


FIGURA 9

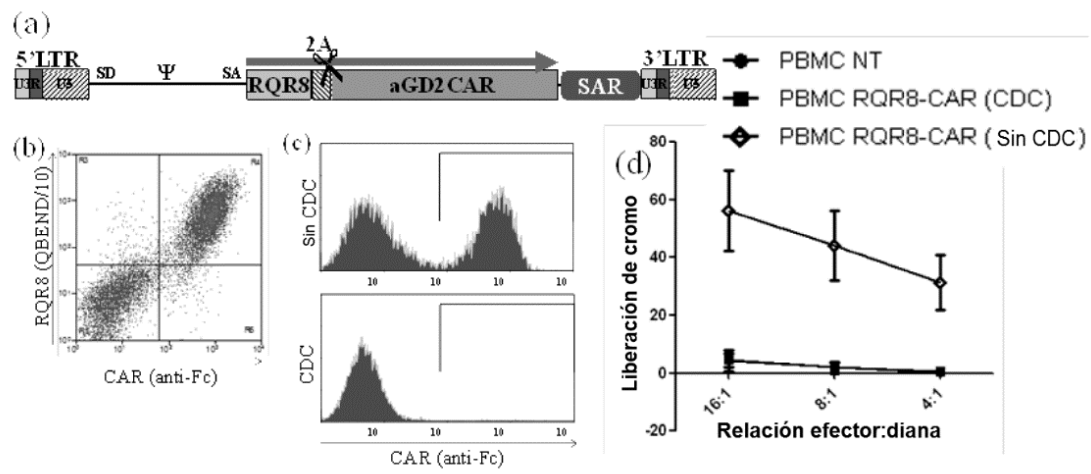


FIGURA 10

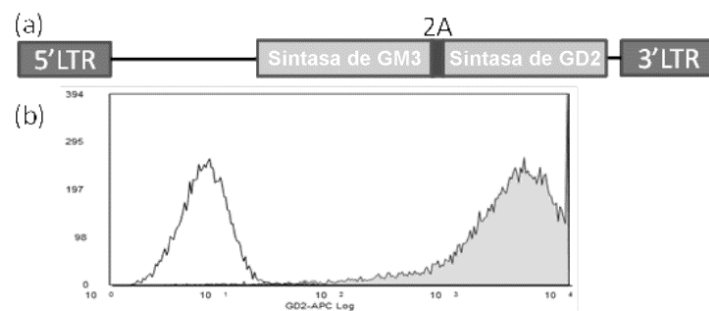


FIGURA 11

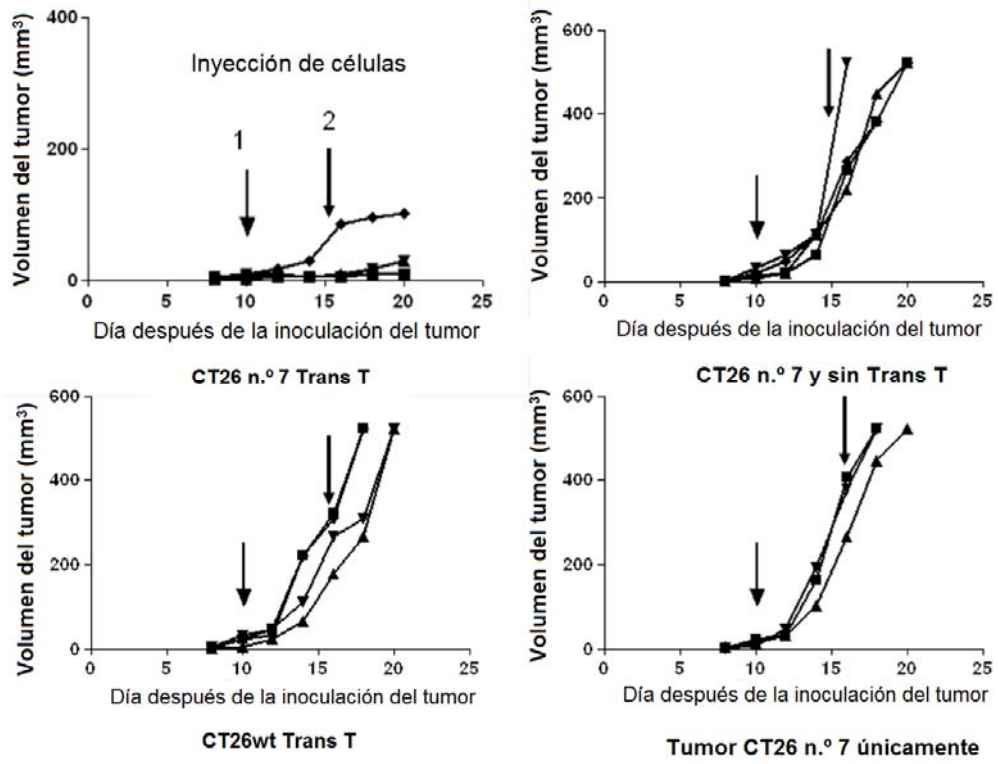


FIGURA 12 continuación

Región	Descripción
Gen suicida	iCasp9 o RQR8
FMD-2A	Péptido 2A de fiebre aftosa
Señal	Péptido señal
scFv1	scFv (muKM666 o huKM666)
SDP	Conector y rotura de cadena
Espaciador	Tallo de CD8alfa
CD28 TM	Dominio transmembranario de CD28
CD28 endo	Endodominio de CD28
OX40 endo	Endodominio de OX40
CD3Z endo	Endodominio de CD3 zeta

FIGURA 13

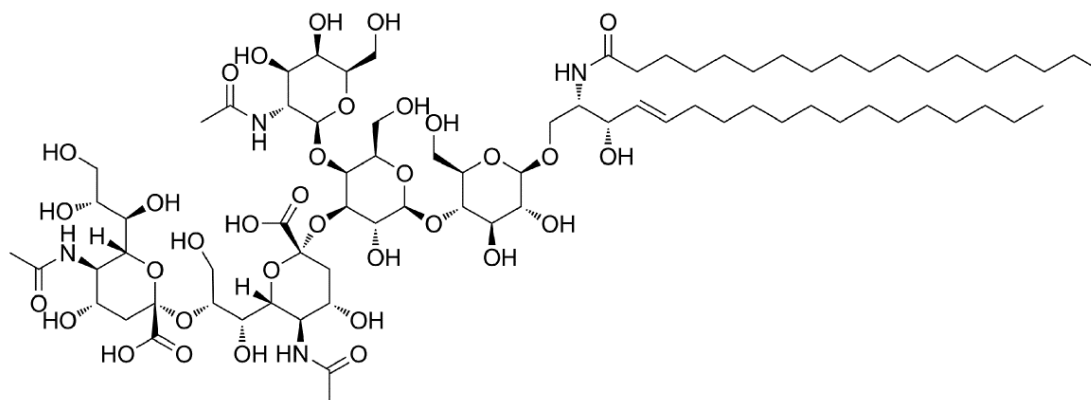


FIGURA 14

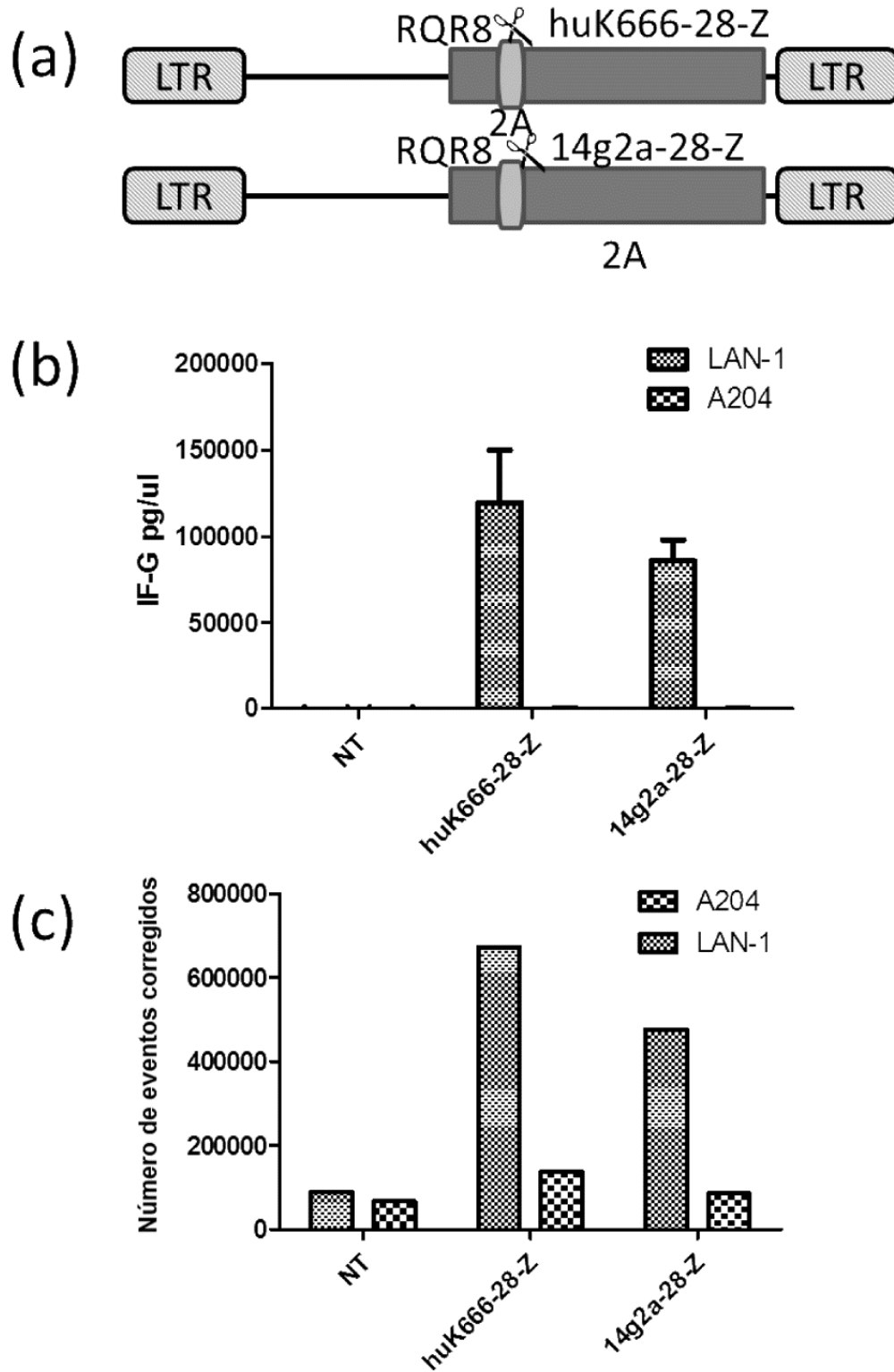
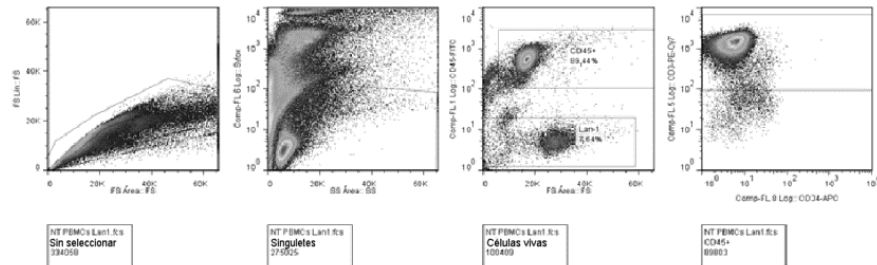


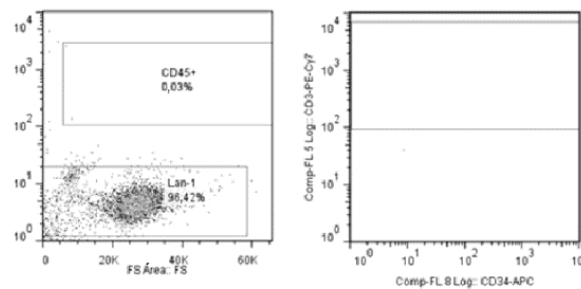
FIGURA 15

(a) Individuales → Células vivas → CD45+ → CD3+ frente a CD34+



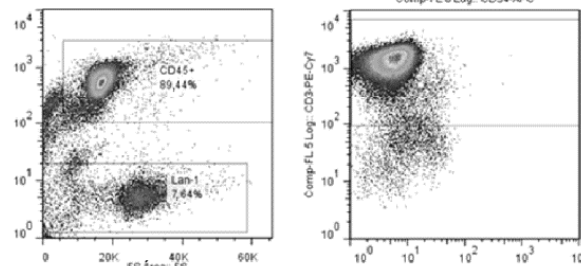
(b)

Lan 1 en solitario



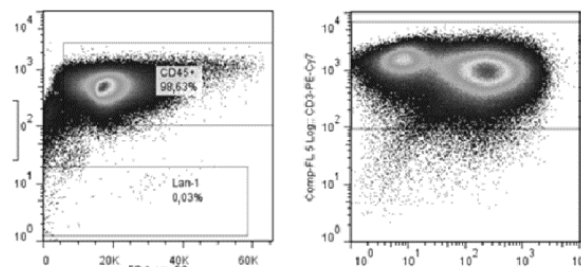
(c)

NT
PBMCs +
Lan-1



(d)

HuK-28Zeta +
Lan1



(e)

14g2a-28Zeta +
Lan1v

