

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 740 903**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.03.2015 PCT/EP2015/055848**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.09.2015 WO15140268**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2015 E 15712105 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019 EP 3119807**

54 Título: **Receptores antigénicos quiméricos específicos de CD123 para inmunoterapia del cáncer**

30 Prioridad:

19.03.2014 DK 201470137

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

07.02.2020

73 Titular/es:

**CELLECTIS (100.0%)
8, rue de la Croix Jarry
75013 Paris, FR**

72 Inventor/es:

GALETTO, ROMAN

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

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

ES 2 740 903 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

Receptores antigénicos quiméricos específicos de CD123 para inmunoterapia del cáncer

5 La presente invención se refiere a receptores antígenos quiméricos (CAR, por sus siglas en inglés *Chimeric Antigen Receptors*) que son proteínas quiméricas recombinantes capaces de redirigir la especificidad y reactividad de las células inmunitarias hacia antígenos de membrana seleccionados, y más particularmente, en los que el dominio de unión a ligando extracelular es un scFV procedente de un anticuerpo monoclonal CD123, que confiere inmunidad específica contra células positivas para CD123. La cadena alfa del receptor de interleucina 3 (CD123) se ha
10 identificado como que se sobreexpresa frecuentemente en células tumorales de leucemia, especialmente en el caso de leucemia mieloide aguda (LMA), en comparación con células madre hematopoyéticas normales. Las células inmunitarias modificadas por ingeniería genética dotadas de los CAR según la invención, muestran mayor eficacia en cuanto al tratamiento de linfomas y de leucemia.

15 Antecedentes de la invención

La inmunoterapia adoptiva, que implica la transferencia de linfocitos T específicos de antígeno autólogos generados *ex vivo*, es una estrategia prometedora para tratar infecciones víricas y cáncer. Los linfocitos T utilizados para inmunoterapia adoptiva pueden generarse mediante expansión de linfocitos T específicos de antígeno o redireccionamiento de linfocitos T mediante modificación por ingeniería genética (Park, Rosenberg et al. 2011). La transferencia de linfocitos T específicos de antígeno vírico es un procedimiento bien establecido utilizado para el tratamiento de infecciones víricas asociadas a trasplante y tumores malignos relacionados con virus poco frecuentes. De manera similar, se ha mostrado que el aislamiento y la transferencia de linfocitos T específicos de tumor tienen éxito en el tratamiento de melanoma.

25 A través de la transferencia genética de receptores de linfocitos T transgénicos o receptores antigénicos quiméricos (CAR), en los linfocitos T se han generado con éxito nuevas especificidades (Jena, Dotti et al. 2010). Los CAR son receptores sintéticos que constan de una porción de direccionamiento que está asociada a uno o más dominios de señalización en una sola molécula de fusión. En general, la porción de unión de un CAR consta de un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo monocatenario (scFv), que comprende los fragmentos ligeros y variables de un anticuerpo monoclonal interconectados por un enlazador flexible. También se han utilizado con éxito porciones de unión basadas en dominios de receptores o ligandos. Los dominios de señalización de los CAR de primera generación proceden de la región citoplasmática del dominio de señalización CD3zeta o de las cadenas gamma de receptores de Fc. Se ha demostrado que los CAR de primera generación redirigen con éxito la citotoxicidad de linfocitos T, sin embargo, no consiguen proporcionar expansión prolongada y actividad antitumoral *in vivo*. Para mejorar la supervivencia y aumentar la proliferación de linfocitos T modificados con CAR, se han añadido dominios de señalización de moléculas coestimuladoras, incluyendo CD28, OX-40 (CD134) y 4-1BB (CD137), solos (segunda generación) o en combinación (tercera generación). Los CAR han permitido que los linfocitos T se redirijan con éxito contra antígenos expresados en la superficie de linfocitos Tumorales de diversos tumores malignos incluyendo linfomas y tumores sólidos (Jena, Dotti et al. 2010).

Por el momento, los tratamientos de inducción para la leucemia mieloide aguda (LMA) han permanecido mayoritariamente sin cambios durante casi 50 años y la LMA sigue siendo una enfermedad de mal pronóstico. La leucemia mieloide aguda (LMA) es una enfermedad caracterizada por la rápida proliferación de células mieloides inmaduras en la médula ósea lo que produce hematopoyesis disfuncional. Aunque la quimioterapia de inducción estándar puede inducir remisiones completas, muchos pacientes finalmente recaen y sucumben a la enfermedad, demandando el desarrollo de nuevas terapias para la LMA.

Avances recientes en la inmunofenotipificación de células de LMA, han revelado que varios antígenos de la superficie celular asociados a la LMA pueden actuar como dianas para futuras terapias. La cadena alfa del receptor de interleucina 3 (IL-3R α ; CD123 - Referencia del NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica): NP_OO 1254642) ha sido identificada como una posible diana inmunoterapéutica ya que se sobreexpresa en células tumorales de LMA en comparación con células madre hematopoyéticas normales. Adicionalmente, se llevaron a cabo dos ensayos clínicos en fase I para terapias específicas de CD123, presentando ambos fármacos buenos perfiles de seguridad (ClinicalTrials.gov ID: NCT00401739 y NCT00397579). Por desgracia, estos fármacos dirigidos a CD123 tenían una eficacia limitada, lo que sugiere que, para observar actividad antileucémica, se requieren alternativas y terapias más fuertes y específicas dirigidas a CD123.

Una terapia alternativa posiblemente más fuerte para el tratamiento de la leucemia, sería el uso de linfocitos T que expresen receptores antigénicos quiméricos (CAR) que redirigen la especificidad de los linfocitos T hacia antígenos asociados a tumores (AAT) de la superficie celular de una manera independiente del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, siglas del inglés *major histocompatibility complex*). Varios grupos han desarrollado CAR dirigidos a varios antígenos para el tratamiento de tumores malignos de linfocitos B. Sin embargo, sigue habiendo escasos linfocitos T modificados por ingeniería genética con CAR para el tratamiento de la LMA.

65 El documento WO 2012/079000 describe receptores antigénicos quiméricos anti-CD19.

S. Gill et al. en "Preclinical targeting of human acute myeloid leukemia and myeloablation using chimeric antigen receptor-modified T cells", *Blood*, vol. 123, no. 15, 2014, páginas 2343-2354, describen construcciones de receptores antigénicos quiméricos que se dirigen a CD123 que comprenden un scFV del clon 32716 o del clon 26292.

5 En particular, aún existe la necesidad de mejorar construcciones de los CAR que muestren una mejor compatibilidad con la proliferación de linfocitos T, para permitir que las células que expresan dichos CAR alcancen una ventaja clínica significativa.

10 Además, existe la necesidad de mejorar los CAR específicos de CD123 que tengan la capacidad de proliferar y de dirigirse selectivamente a células que expresan CD123.

Adicionalmente, el uso de dichos linfocitos T inmunitarios que expresan CAR que se dirigen a CD123 en combinación con agentes quimioterapéuticos citotóxicos como tratamiento habitualmente empleado como tratamiento contra el cáncer sigue siendo un problema.

15 Se han desarrollado diversos agentes citotóxicos, tales como antimetabolitos, agentes alquilantes, antraciclinas, inhibidores de ADN metiltransferasa, compuestos de platino y venenos de huso, para destruir células cancerosas, en particular, células cancerosas que expresan CD123.

20 Estos agentes quimioterapéuticos pueden ser perjudiciales para el establecimiento de células inmunocompetentes antitumorales robustas debido a su toxicidad inespecífica. Las terapias basadas en moléculas pequeñas dirigidas a las rutas de proliferación celular también pueden obstaculizar el establecimiento de la inmunidad antitumoral.

25 Por tanto, también existe la necesidad de desarrollar linfocitos T dirigidos a CD123 que sean específicos y compatibles con el uso de fármacos, en particular de quimioterapias contra el cáncer, como las que afectan a la proliferación celular.

30 Por tanto, para utilizar células terapéuticas alogénicas "listas para usar" junto con la quimioterapia, los inventores desarrollan un método de modificación por ingeniería genética de linfocitos T alogénicos, menos alogénicos y resistentes a agentes quimioterapéuticos. Los beneficios terapéuticos que ofrece esta estrategia deben potenciarse por los efectos sinérgicos entre la quimioterapia y la inmunoterapia. Por otra parte, la resistencia a fármacos también puede beneficiarse de la capacidad de expandir selectivamente los linfocitos T modificados por ingeniería genética para impedir que se produzcan problemas debidos a la transferencia ineficaz de genes a estas células.

35 **Sumario de la invención**

Los inventores han generado un CAR específico de CD123 que tiene un diseño diferente y que comprende diferentes scFV procedentes de anticuerpos específicos de CD123. Estos CAR específicos de CD123 se denominan CAR específicos de CD123 o CAR anti-CD123, o CAR 123 o "CAR de la invención" indistintamente.

40 En particular, los inventores han desarrollado un CAR específico de CD123 que comprende un scFV procedente de Klon43 con diferentes arquitecturas e identificaron construcciones de CAR altamente específicas y muy selectivas que se unen a células que expresan CD123 y que destruyen selectivamente células cancerosas que expresan CD123.

45 Tras la activación inespecífica *in vitro* (por ejemplo, con perlas revestidas con anti CD3/CD28 e IL2 recombinante), los linfocitos T de donantes se han transformado con polinucleótidos que expresan estos CAR utilizando transducción vírica. En determinados casos, adicionalmente, los linfocitos T se modificaron por ingeniería genética para crear linfocitos T no alorreactivos, más especialmente por la alteración de un componente de TCR (receptores $\alpha\beta$ de linfocitos T) para impedir la reacción de injerto contra hospedador.

50 Adicionalmente, los linfocitos T se modificaron por ingeniería genética para crear linfocitos T resistentes a fármacos contra el cáncer, para su uso en combinación con dichos fármacos clásicos contra el cáncer.

55 Los linfocitos T modificados por ingeniería genética resultantes mostraron reactividad *in vitro* contra células positivas para CD123 a varias extensiones, lo que demuestra que los CAR de la presente invención contribuyen a la activación dependiente de antígeno, y también a la proliferación, de los linfocitos T, haciéndolos útiles para la inmunoterapia.

60 Los linfocitos T modificados por ingeniería genética resultantes mostraron reactividad *in vivo* contra células positivas para CD123 y redujeron significativamente el número de células cancerosas *in vivo*.

65 Los linfocitos T modificados por ingeniería genética de la invención están diseñados para mostrar reactividad *in vivo* contra células positivas para CD123, pueden utilizarse en simultáneo con fármacos contra el cáncer, y se toleran bien. En una realización particular, los linfocitos T modificados por ingeniería genética según la invención siguen

siendo eficaces incluso después de varias administraciones, haciéndolos útiles para la inmunoterapia como primer tratamiento (inducción), como tratamiento de consolidación, como tratamiento en combinación con quimioterapia clásica contra el cáncer. En la presente memoria descriptiva se detallan secuencias de polipéptidos y de polinucleótidos que codifican los CAR de la presente invención.

5 Las células inmunitarias modificadas por ingeniería genética de la presente invención son particularmente útiles para aplicaciones terapéuticas tales como para tratamientos de linfoma de linfocitos B o de leucemia.

Breve descripción de las figuras

10 **Figura 1:** Representación esquemática de una célula inmunitaria modificada por ingeniería genética según la invención. La célula inmunitaria modificada por ingeniería genética en esta figura es un linfocito T transducido con un polipéptido retroviral que codifica un CAR. Adicionalmente, este linfocito T se modificada por ingeniería genética para permitir una mejor injertación, y más segura, en el paciente, que es opcional dentro del marco de la presente invención. El gen X puede ser, por ejemplo, un gen que exprese un componente del TCR (TCRalfa o TCRbeta), Y puede ser un gen implicado en la sensibilidad de linfocitos T a fármacos inmunosupresores como CD52 (con respecto a Campath) o HPRT (con respecto a 6-tioguanina).

20 **Figura 2:** Representación esquemática de las diferentes arquitecturas (VI a V6) de los CAR de la invención (CAR 123)

Figura 3: Muestra las diferentes arquitecturas del CAR según la invención, cada una de las cuales difiere en la región de bisagra utilizada.

25 **Figura 4:** muestra la actividad de desgranulación en porcentaje (%) de la desgranulación de los 6 scFv diferentes para una sola arquitectura (v3: CD8-bisagra/CD8-transmembrana), cuando los linfocitos T CAR+ se cultivaron conjuntamente durante 6 horas con células que expresaban CD123 (RPM18226), o con células que no expresaban CD123 (K562). Las barras blancas corresponden a señales de desgranulación observadas en linfocitos T que se cultivaron solos, las barras negras representan las señales observadas cuando los linfocitos T se cultivaron conjuntamente con células RPM18226, y las barras grises muestran señales de desgranulación de linfocitos T cultivados conjuntamente con células K562.

35 La **figura 5:** muestra la actividad de desgranulación (linfocitos CD107a+) en intensidad de fluorescencia media (IFM) de linfocitos T CAR después de 6 h de cultivo conjunto con linfocitos CD123neg (K562) o con linfocitos que expresan niveles altos o bajos de CD123 (RPM18226 y KG1a, respectivamente).

40 La **figura 6:** muestra el porcentaje (%) de desgranulación, de diversos linfocitos T CAR anti-CD123 cuando se cultivan conjuntamente durante 6 h con células que expresan diferentes niveles de CD123 (KG1a o RPM18226), o con células que no expresan CD123 (K562).

Figura 7: muestra la cantidad de IFN gamma (IFN γ) liberada por varios linfocitos T CAR anti-CD123 cuando se cultivan conjuntamente durante 24 h con células que expresan diferentes niveles de CD123 (KG1a o RPM18226), o con células que no expresan CD123 (K562).

45 **Figura 8:** muestra la actividad citolítica específica de varios linfocitos T CAR anti-CD123. Los ensayos se realizaron 48 h después de la transfección de ARNm de CAR. Los linfocitos T se cultivaron conjuntamente con células K562+KG1a o K562+RPM18226. Al final del cocultivo, se determinó la viabilidad celular de cada una de las líneas celulares y se calculó un porcentaje específico de lisis celular.

50 **Figura 9:** muestra la construcción general utilizada para la transducción de linfocitos T y el porcentaje (%) de linfocitos T que expresan el CAR o la BFP (*Blue Fluorescent Protein*, proteína fluorescente azul) el Día 8 o 10 después de la transducción de dos donantes diferentes, que se analizó mediante citometría de flujo. Los CAR corresponden a construcciones CAR Klon 43-v3 y CAR 32716-V3.

55 **Figura 10:** representa la actividad de desgranulación de linfocitos T que expresan CAR Klon 43-v3 y CAR 32716-V3, contra diferentes líneas celulares (células Daudi y K562 que no expresan CD123, KG1a, MOLM13 y RPM18226 que expresan niveles crecientes de CD123 (KG1a<MOLM13<RPM18226). En el panel superior se da el % de linfocitos CD107a+ (entre los linfocitos CD8+) de tres donantes independientes y en el panel inferior se muestra la intensidad de la tinción de CD107a de un donante representativo. NTD significa células No Transducidas.

60 **Figura 11:** muestra la liberación de IFN gamma después de 24 horas de cultivo conjunto de linfocitos T que expresan CAR Klon 43-v3 y CAR 32716-V3 con diferentes líneas celulares.

65 **Figura 12:** muestra la actividad citolítica específica de linfocitos T que expresan CAR Klon 43-v3 y CAR 32716-V3. Se calculó un porcentaje específico de lisis celular. Los resultados representan resultados obtenidos en al menos dos donantes independientes.

Figura 13: muestra una actividad de desgranulación (en porcentaje (%)) de desgranulación) de linfocitos T que expresan CAR Klon 43-v3 y CAR 32716-V3.

5 **Figura 14:** muestra una actividad de desgranulación (en IFM) de linfocitos T que expresan CAR Klon 43-v3 y CAR 32716-V3.

10 **Figura 15:** muestra la actividad *in vivo* de linfocitos T que expresan el CAR Klon43-v3 en ratones NOG inmunodeficientes. Los ratones recibieron una inyección de células MOLM13-Luciferasa 2 o 7 días antes de la inyección de linfocitos T humanos no transducidos, y con diferentes dosis de linfocitos T CAR+ anti-CD123. Los resultados representan la señal bioluminiscente observada en diferentes puntos de tiempo después de la inyección de linfocitos T (media de 4 ratones en cada grupo, excepto para G12, donde 1 de los 4 ratones murieron entre los días 21 y 28).

15 **Tabla 1:** Secuencia de los diferentes componentes CAR

Dominios funcionales	SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos natural
Péptido señal CD8α	SEQ ID NO: 1	MALPVTALLLPLALLLHAARP
Péptido señal alternativo	SEQ ID NO: 2	METDTLLLWVLLLVPGSTG
bisagra FcγRIIIα	SEQ ID NO: 3	GLAVSTISSFFPPGYQ
bisagra CD8α	SEQ ID NO: 4	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG GAVHTRGLDFACD
bisagra IgG1	SEQ ID NO: 5	EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKP KDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSV HEALHNHYTQKSLSLSPGK
dominio transmembrana CD8a	SEQ ID NO: 6	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
dominio transmembrana 41BB	SEQ ID NO: 7	IISFFLALTSTALLFLFLTRFSVV
dominio intracelular 41BB	SEQ ID NO: 8	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC RFPEEEEGGCEL
dominio intracelular CD3ζ	SEQ ID NO: 9	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRR EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGL YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDH GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
Enlazador	SEQ ID NO: 10	GGGGSGGGGSGGGGS

Tabla 2: Secuencia de los diferentes componentes CAR

Secuencias scFv	SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos natural
región variable de cadena pesada 7G3	SEQ ID NO: 11	MGWSWIFLFLVSGTGGVLSEVQLQQSGPELVKPGASV KMSCKASGYTFTDYMKWVKQSHGKSLEWIGDIIPNSG ATFYNQKFKGKATLTVDSSSTAYMHLNSLTSEDSAVVY CTRSHLLRASWFAYWGQGLTVTSAAS
región variable de cadena ligera 7G3	SEQ ID NO: 12	MESQTQVLMSELLFWVSGTCGDFVMTQSPSLTVTAGE KVTMSCKSSQSLNSGNQKNYLTWYLQKPGQPPKLLIY WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYC QNDYSYPYTFGGGKLEIKR
región variable de cadena pesada Old4	SEQ ID NO: 13	WTWRFLFVAAATGVQSQVQLLQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSTYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFIV NYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA RGGGSGPDVLDIWGQGTMTVSSAST
región variable de cadena ligera Old4	SEQ ID NO: 14	MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCVIWMQTQSPSLLSAST GDRVITISCRMSQGIRSYLAWYQQKPGKAPPELLIYAASL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQSEDFATYYCQQYYSF PYTFGQGTKLEIKRTV
región variable de cadena pesada 26292	SEQ ID NO: 15	QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNW VKQRPDQGLEWIGRIDPYDSETHYNQKFKDKAILTVDKS SSTAYMQLSSLTSEDSAVVYCARGNWDDYWGQGTTLT VSS
región variable de cadena ligera 26292	SEQ ID NO: 16	DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKSISKDLAWYQEKP GKTNKLLIYSGSTLQSGIPSRFSGSGSGTDFTLTISLPEP FAMYYCQQHNKYPYTFGGGKLEIK
región variable de cadena pesada 32716	SEQ ID NO: 17	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYIFTNYGMNWVK QAPGKSFKWMGWINTYTGESTYSADFKGRFAFSLETS STAYLHINDLKNEDTATYFCARSGGYDPM DYWGQGT VTVSS
región variable de cadena ligera 32716	SEQ ID NO: 18	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESDNYGNTFMH WYQQKPGQPPKLLIYRASNLESGIPARFSGSGSRDFTLT INPVEADDVATYYCQSNEDPPTFGAGTKLELK

(continuación)

Secuencias scFv	SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos natural
región variable de cadena pesada Klon43	SEQ ID NO: 19	MADYKDIVMTQSHKFMSTSVGDRVNITCKASQNVDSA VAWYQQKPGQSPKALIYSASYRYSGVPDRFTGRGSGTD FTLTSSVQAEDLAVYYCQQYYSTPWTFGGGTTKLEIKR
región variable de cadena ligera Klon43	SEQ ID NO: 20	EVKLVESGGGLVQPGGSLSLSCAASGFTFTDYYSWVR QPPGKALEWLALIRSKADGYTTEYSASVKGRFTLSRDDSD QSILYLQMNALRPEDSATYYCARDAAAYSYSPGAMD YWGQGTSTVSS
región variable de cadena pesada 12F1	SEQ ID NO: 21	VQLQESGPGLVKPSQSLTCSVTDYISITSGYYWNWIRQ FPGNKLEWMGYISYDGSNNYNPSLKNRISITRDTSKNQF FLKSSVTTEDTATYYCSRGEFGYFDSWGQGTTLTVSSA RS
región variable de cadena ligera 12F1	SEQ ID NO: 22	DIMMSQSPSSLAVSVGEKFTMTCKSSQSLFFGSTQKNYL AWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDF TLAISSVMPEDLAVYYCQQYYNYPWTFGGGTTKLEIK

Tabla 3: CAR de estructura V-1

Nombre del CAR	Estructura del CAR						
V-1	péptido señal (opcional)	VH	VL	bisagra FcyRIIIa	CD8α TM	41BB-IC	CD3ζ, CD
7G3-1 (SEQ ID NO: 23)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9
26292-1 (SEQ ID NO: 30)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9
32716-1 (SEQ ID NO: 36)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9
Kl043-1 (SEQ ID NO: 42)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9

Tabla 4: CAR de estructura V-2

Nombre del CAR	Estructura del CAR						
V-2	péptido señal (opcional)	VH	VL	bisagra FcyRIIIa	41BB-TM	41BB-IC	CD3ζ, CD
7G3-2 (SEQ ID NO: 24)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9
26292-2 (SEQ ID NO: 31)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9
32716-2 (SEQ ID NO: 37)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9
Kl043-2 (SEQ ID NO: 43)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9

ES 2 740 903 T3

Tabla 5: CAR de estructura V-3

Nombre del CAR	Estructura del CAR						
V-3	péptido señal (opcional)	VH	VL	bisagra CD8 α	CD8a TM	41BB-IC	CD3 ζ CD
7G3-3 (SEQ ID NO: 25)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9
Old4-3 (SEQ ID NO: 29)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9
26292-3 (SEQ ID NO: 32)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9
32716-3 (SEQ ID NO: 38)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9
Klo43-3 (SEQ ID NO: 44)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9
12SF1-3 (SEQ ID NO: 48)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9

Tabla 6: CAR de estructura V-4

Nombre del CAR	Estructura del CAR						
V-4	péptido señal (opcional)	VH	VL	bisagra CD8 α	41BB-TM	41BB-IC	CD3 ζ CD
7G3-4 (SEQ ID NO: 26)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9
26292-4 (SEQ ID NO: 33)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9
32716-4 (SEQ ID NO: 39)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9
Klo43-4 (SEQ ID NO: 45)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9

Tabla 7: CAR de estructura V-5

Nombre del CAR	Estructura del CAR						
V-5	péptido señal (opcional)	VH	VL	bisagra IgG1	CD8 α TM	41BB-IC	CD3 ζ CD
7G3-5 (SEQ ID NO: 27)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9
26292-5 (SEQ ID NO: 34)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9
32716-5 (SEQ ID NO: 40)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9
Klo43-5 (SEQ ID NO: 46)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9

Tabla 8: CAR de estructura V-6

Nombre del CAR	Estructura del CAR						
V-6	péptido señal (opcional)	VH	VL	bisagra IgG1	41BB-TM	41BB-IC	CD3 ζ CD
7G3-6 (SEQ ID NO: 28)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9
26292-6 (SEQ ID NO: 35)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9
32716-6 (SEQ ID NO: 41)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9
Klo43-6 (SEQ ID NO: 47)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9

Descripción detallada de la invención

5 Salvo que se defina específicamente en el presente documento, todos los términos técnicos y científicos utilizados tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la materia en los campos de la terapia génica, bioquímica, genética y biología molecular.

10 Todos los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden usar en la práctica o el ensayo de la presente invención, con métodos y materiales adecuados que se describen en el presente documento. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Adicionalmente, los materiales, métodos y ejemplos, son solamente ilustrativos y no se pretende que sean limitantes, a menos que se especifique otra cosa.

15 La práctica de la presente invención empleará, salvo que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de las habilidades en la técnica. Dichas técnicas se explican por completo en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley y son Inc, Library of Congress, USA); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Tercera Edición, (Sambrook et al, 2001, Cold Spring Harbor, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); Mullis et al. patente de Estados Unidos No 4,683,195; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Harries y S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames y S. J. Higgins eds. (1984)]; Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); la serie, Methods In ENZYMOLOGY (J. Abelson y M. Simon, eds.-in-chief, Academic Press, Inc., Nueva York), específicamente, Vols.154 y 155 (Wu et al. eds.) y Vol. 185, "Gene Expression Technology" (D. Goeddel, ed.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller y M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer y Walker, eds., Academic Press, Londres, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volúmenes I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds., 1986); y Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1986).

30 La presente invención proporciona un CAR específico de CD123 que comprende un scFV procedente de Klon43.

35 La presente invención describe un receptor antigénico quimérico específico de CD123 ("CAR 123" o "CAR") que tiene una de las estructuras polipeptídicas seleccionadas de V1, V3 y V5, como se ilustra en la figura 2, comprendiendo dicha estructura un dominio de unión a ligando extracelular que comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL) de un anticuerpo monoclonal anti-CD123, una bisagra de FcγRIIIα, CD8α o IgG1, un dominio transmembrana CD8α, un dominio citoplasmático que incluye un dominio de señalización zeta CD3 y un dominio coestimulador de 4-1BB, en donde dicha VH comprende las secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 67, 68 y 69 y dicha VL comprende las secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 70, 71 y 72.

45 La presente invención desvela un receptor antigénico quimérico específico de CD123 (CAR 123) que tiene una de las estructuras polipeptídicas seleccionadas de V1, V3 y V5, como se ilustra en la figura 2, comprendiendo dicha estructura un dominio de unión a ligando extracelular que comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL) de un anticuerpo monoclonal anti-CD123, una bisagra de FcγRIIIα, CD8α o IgG1, un dominio transmembrana CD8α, un dominio citoplasmático que incluye un dominio de señalización zeta CD3 y un dominio coestimulador de 4-1BB, en donde dicho CAR 123 tiene una identidad de secuencia de al menos 80 % con la SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44 o SEQ ID NO: 46, respectivamente, y en donde dicha VH comprende las secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 67, 68 y 69 y dicha VL comprende las secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 70, 71 y 72.

55 La presente invención desvela un receptor antigénico quimérico específico de CD123 (CAR 123) que tiene una de las estructuras polipeptídicas seleccionadas de V1, V3 y V5, como se ilustra en la figura 2, comprendiendo dicha estructura un dominio de unión a ligando extracelular que comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena pesada (VL) de un anticuerpo monoclonal anti-CD123, una bisagra de FcγRIIIα, CD8α o IgG1, un dominio transmembrana CD8α, un dominio citoplasmático que incluye un dominio de señalización zeta CD3 y un dominio coestimulador de 4-1BB, en donde dicho 123 CAR tiene una identidad de secuencia de al menos 80 % con la SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76 o SEQ ID NO. 77, respectivamente, y en donde dicha VH comprende las secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 67, 68 y 69 y dicha VL comprende las secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 70, 71 y 72.

65 La presente invención desvela un receptor antigénico quimérico específico (CAR 123) que tiene una estructura polipeptídica V3 como se ilustra en la Figura 2, y se describe anteriormente, en donde dicho CAR 123 tiene una identidad de secuencia de al menos 80 % con la SEQ ID NO: 42.

La presente invención describe un receptor antigénico quimérico específico (CAR 123) que tiene una estructura

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTDYMSWVRQAPGKGLEWVGLIRSKADGYTTEYSAS
VKGRFTISRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAVYYCARDAAAYSSYSPGAMDYWGQGLTVTVSS,

(Variante VH2: SEQ ID NO: 61):

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTDYMSWVRQAPGKGLEWVGLIRSKADGYTTEYSAS
VKGRFTISRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAVYYCARDAAAYSSYSPGAMDYWGQGLTVTVSS,

5

(Variante VH3: SEQ ID NO: 62):

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTDYMSWVRQAPGKGLEWVGLIRSKADGYTTEYSAS
VKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCARDAAAYSSYSPGAMDYWGQGLTVTVSS,

(Variante VH4: SEQ ID NO: 63):

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTDYMSWVRQAPGKGLEWVGFIRSKADGYTTEYSAS
VKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCARDAAAYSSYSPGAMDYWGQGLTVTVSS,

10

(Variante VH5: SEQ ID NO: 64):

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTDYMSWVRQAPGKGLEWVGFIRSKADGYTTEYAAS
VKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCARDAAAYSSYSPGAMDYWGQGLTVTVSS,

15

(Variante VH6: SEQ ID NO: 65):

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTDYMSWVRQAPGKGLEWVGLIRSKADGYTTEYAAS
VKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCARDAAAYSSYSPGAMDYWGQGLTVTVSS,

(Variante VH7: SEQ ID NO: 66):

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTDYMSWVRQAPGKGLEWVGFIRSKADGYTTEYAAS
VKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRDAAYSSYSPGAMDYWGQGLTVTVSS,

20

(Variante VL1: SEQ ID NO: 54):

MADYKDIVMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQNVDSAVAWYQQKPGKAPKALIYSASYRYSRVPS
RFSGRGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQYYSTPWTFGQGTKVEIKR,

(Variante VL2: SEQ ID NO: 55):

MADYKDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQNVDSAVAWYQQKPGKAPKALIYSASYRYSRVPS
RFSGRGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQYYSTPWTFGQGTKVEIKR,

25

(Variante VL3: SEQ ID NO: 56):

MADYKDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQNVDSAVAWYQQKPGKAPKALIYSASYRYSRVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQYYSTPWTFGQGTKVEIKR,

30

(Variante VL4: SEQ ID NO: 57):

MADYKDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQNVDSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYSRVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQYYSTPWTFGQGTKVEIKR,

(Variante VL5: SEQ ID NO: 58):

MADYKDIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQNVDSAAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSTPWTFGQGTKVEIKR, y

(Variante VL6: SEQ ID NO: 59):

5 MADYKDIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQNVDSAAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYGQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSTPWTFGQGTKVEIKR, o una de sus combinaciones.

10 La presente invención desvela un receptor antigénico quimérico (CAR) específico de CD123 como se describe
anteriormente, donde dichos dominio VH y VL de unión a ligando extracelular de un anticuerpo anti-CD123
monoclonal comprende respectivamente al menos una de las siguientes secuencias:

EVKLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTDYMSWVRQAPGKGLEWVGLIRSKADGYTTEYSAS
VKGRFTISRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAVYYCARDAAAYSYSSPEGAMDYWGQGLTVTVSS,

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTDYMSWVRQAPGKGLEWVGLIRSKADGYTTEYSAS
VKGRFTISRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAVYYCARDAAAYSYSSPEGAMDYWGQGLTVTVSS,

15 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTDYMSWVRQAPGKGLEWVGLIRSKADGYTTEYSAS
VKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCARDAAAYSYSSPEGAMDYWGQGLTVTVSS,

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTDYMSWVRQAPGKGLEWVGFIRSKADGYTTEYSAS
VKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCARDAAAYSYSSPEGAMDYWGQGLTVTVSS,

20 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTDYMSWVRQAPGKGLEWVGFIRSKADGYTTEYAAS
VKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCARDAAAYSYSSPEGAMDYWGQGLTVTVSS,

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTDYMSWVRQAPGKGLEWVGLIRSKADGYTTEYAAS
VKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCARDAAAYSYSSPEGAMDYWGQGLTVTVSS,

25 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTDYMSWVRQAPGKGLEWVGFIRSKADGYTTEYAAS
VKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRDAAYSYSSPEGAMDYWGQGLTVTVSS,

MADYKDIVMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQNVDSAAVAWYQQKPGKAPKALIYSASYRYSVPS
RFSGRGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSTPWTFGQGTKVEIKR,

MADYKDIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQNVDSAAVAWYQQKPGKAPKALIYSASYRYSVPS
RFSGRGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSTPWTFGQGTKVEIKR,

30 MADYKDIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQNVDSAAVAWYQQKPGKAPKALIYSASYRYSVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSTPWTFGQGTKVEIKR,

MADYKDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQNVDSAAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYSVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSTPWTFGQGTKVEIKR,

MADYKDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQNVDSAAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSTPWTFGQGTKVEIKR, y

5

MADYKDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQNVDSAAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYGQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYPTFGQGTKVEIKR, o una de sus combinaciones.

10

De manera ventajosa, la presente invención desvela un receptor antigénico quimérico (CAR) específico de CD123 como se describe anteriormente, donde dichos dominio VH y VL de unión a ligando extracelular de un anticuerpo anti-CD123 monoclonal comprende respectivamente al menos una de las siguientes secuencias:

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTDYMSWVRQAPGKGLEWVGLIRSKADGYTTEYSAS
VKGRFTISRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAVYYCARDAAAYSYSPGAMDYWGQGLTVTVSS,

15

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTDYMSWVRQAPGKGLEWVGLIRSKADGYTTEYSAS
VKGRFTISRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAVYYCARDAAAYSYSPGAMDYWGQGLTVTVSS,

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTDYMSWVRQAPGKGLEWVGLIRSKADGYTTEYSAS
VKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCARDAAAYSYSPGAMDYWGQGLTVTVSS,

20

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTDYMSWVRQAPGKGLEWVGFIRSKADGYTTEYSAS
VKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCARDAAAYSYSPGAMDYWGQGLTVTVSS,

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTDYMSWVRQAPGKGLEWVGFIRSKADGYTTEYAAS
VKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCARDAAAYSYSPGAMDYWGQGLTVTVSS,

25

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTDYMSWVRQAPGKGLEWVGLIRSKADGYTTEYAAS
VKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCARDAAAYSYSPGAMDYWGQGLTVTVSS,

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTDYMSWVRQAPGKGLEWVGFIRSKADGYTTEYAAS
VKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRDAAYSYSPGAMDYWGQGLTVTVSS, y al menos una de las siguientes secuencias:

30

MADYKDIVMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQNVDSAAVAWYQQKPGKAPKALIYSASYRYSVPS
RFSGRGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSTPWTFGQGTKVEIKR,

MADYKDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQNVDSAAVAWYQQKPGKAPKALIYSASYRYSVPS
RFSGRGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSTPWTFGQGTKVEIKR,

MADYKDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQNVDSAAVAWYQQKPGKAPKALIYSASYRYSVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSTPWTFGQGTKVEIKR,

MADYKDIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQNVDSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYSQVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYYSTPWTFGQGTKVEIKR,

MADYKDIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQNVDSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYYSTPWTFGQGTKVEIKR,

MADYKDIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQNVDSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYGQSGVP
5 SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYYSTPWTFGQGTKVEIKR.

La presente invención desvela un CAR específico de CD123 como se describe anteriormente, en donde dicha estructura V3 comprende una bisagra CD8 alfa y un dominio transmembrana CD8 alfa.

10 La presente invención desvela un CAR específico de CD123 como se describe anteriormente, en donde dicha estructura V3 comprende una bisagra de CD8 alfa, un dominio citoplasmático 41BBB y un dominio transmembrana CD8 alfa.

15 La presente invención desvela un CAR específico de CD123 como se ha indicado anteriormente, en donde dichos VH y VL tienen una identidad de al menos 80 % con una secuencia polipeptídica seleccionada de SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20.

20 La presente invención desvela un CAR específico de CD123 como se ha indicado anteriormente, en donde dichos VH y VL tienen una identidad de al menos 80 % con un polipéptido de SEQ ID NO: 19 y/o de SEQ ID NO: 20.

La presente invención desvela un CAR específico de CD123 como se ha indicado anteriormente, que comprende además otro dominio de unión a ligando extracelular que no es específico de CD123.

25 La presente invención desvela un CAR específico de CD123 como se ha indicado anteriormente, que adicionalmente comprende un péptido señal, preferentemente de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

La presente invención desvela un CAR específico de CD123 como se ha indicado anteriormente, donde se inserta un enlazador de SEQ ID NO 10 entre VH y VL.

30 La presente invención desvela un polinucleótido que codifica un receptor antigénico quimérico específico de CD123 según uno cualquiera de los CAR específicos de CD123 descritos anteriormente, comprendiendo dicho polinucleótido adicionalmente un péptido señal, preferentemente de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

35 La presente invención desvela un vector de expresión que comprende un polinucleótido como se ha indicado anteriormente.

40 La presente invención desvela una célula inmunitaria modificada por ingeniería genética que expresa, en la membrana de la superficie celular, un receptor antigénico quimérico específico de CD123 como se describe anteriormente, preferentemente una célula inmunitaria modificada por ingeniería genética que puede expresar, en la membrana de la superficie celular, un receptor antigénico quimérico específico de CD123 como se describe anteriormente.

45 La presente invención desvela una célula inmunitaria modificada por ingeniería genética como se ha indicado anteriormente, procedente de linfocitos T, opcionalmente resistente a un fármaco contra el cáncer y que lleva una delección en un gen que codifica un TCR alfa o un TCR beta.

La presente invención desvela una célula inmunitaria modificada por ingeniería genética como se ha indicado anteriormente, en donde se suprime la expresión de TCR.

50 La presente invención desvela una célula inmunitaria modificada por ingeniería genética como se ha indicado anteriormente, en donde la expresión de al menos una proteína del MHC, preferentemente β 2m o HLA, se suprime en dicha célula inmunitaria modificada por ingeniería genética. β 2m representa a la beta 2 microglobulina y HLA al antígeno leucocitario humano (siglas del inglés, *human leukocyte antigen*). La proteína del MHC es una proteína del MHC de clase I o de clase II.

55 La presente invención desvela una célula inmunitaria modificada por ingeniería genética como se ha indicado anteriormente, donde dicha célula inmunitaria modificada por ingeniería genética se muta para conferir resistencia a

al menos un fármaco inmunosupresor, un fármaco quimioterapéutico o un fármaco contra el cáncer.

La presente invención desvela una célula inmunitaria modificada por ingeniería genética como se ha indicado anteriormente para su uso en terapia.

5 La presente invención desvela una célula inmunitaria modificada por ingeniería genética para su uso en terapia como se ha indicado anteriormente, en donde el paciente es un ser humano.

10 La presente invención desvela una célula inmunitaria modificada por ingeniería genética para su uso en terapia como se ha indicado anteriormente, en donde la afección es una afección de cáncer pre-maligno o maligno caracterizada por células que expresan CD123.

15 La presente invención desvela una célula inmunitaria modificada por ingeniería genética para su uso en terapia como se ha indicado anteriormente, en donde la afección es una afección que se caracteriza por una sobreabundancia de células que expresan CD123.

20 La presente invención desvela una célula inmunitaria modificada por ingeniería genética para su uso en terapia como se ha indicado anteriormente, en donde la afección de cáncer maligno es una afección de cáncer hematológico.

La presente invención desvela una célula inmunitaria modificada por ingeniería genética para su uso en terapia como se ha indicado anteriormente, en donde la afección de cáncer hematológico es leucemia o trastornos linfoproliferativos malignos.

25 La presente invención desvela una célula inmunitaria modificada por ingeniería genética para su uso en terapia como se ha indicado anteriormente, en donde dicha leucemia se selecciona del grupo que consiste en leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, síndrome mielodisplásico, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica y síndrome mielodisplásico.

30 La presente invención desvela una célula inmunitaria modificada por ingeniería genética para su uso en terapia como se ha indicado anteriormente, en donde la leucemia es leucemia mielógena aguda (LMA).

La presente invención desvela una célula inmunitaria modificada por ingeniería genética para su uso en terapia como se ha indicado anteriormente, donde dicho cáncer hematológico es un trastorno linfoproliferativo maligno.

35 La presente invención desvela una célula inmunitaria modificada por ingeniería genética para su uso en terapia como se ha indicado anteriormente, donde dicho trastorno linfoproliferativo maligno es linfoma.

40 La presente invención desvela una célula inmunitaria modificada por ingeniería genética para su uso en terapia como se ha indicado anteriormente, en donde dicho linfoma se selecciona del grupo que consiste en mieloma múltiple, linfoma no Hodgkin, linfoma de Burkitt y linfoma folicular (células pequeñas y células grandes).

45 La presente invención desvela un método para dañar una célula cancerosa hematológica que comprende poner en contacto dicha célula cancerosa hematológica con una célula modificada por ingeniería genética según la invención, en una cantidad eficaz para causar el deterioro de dicha célula cancerosa.

La presente invención desvela un método de modificación por ingeniería genética de una célula inmunitaria que comprende:

50 (a) Proporcionar una célula inmunitaria,
(b) Expresar, en la superficie de dicha célula, al menos un receptor antigénico quimérico específico de CD123 según la invención.

55 La presente invención desvela un método de modificación por ingeniería genética de una célula inmunitaria como se ha indicado anteriormente, que comprende:

60 (a) Proporcionar una célula inmunitaria,
(b) Introducir, en dicha célula, al menos un polinucleótido que codifique dicho receptor antigénico quimérico específico de CD123,
(c) Expresar dicho polinucleótido en dicha célula.

La presente invención desvela un método de modificación por ingeniería genética de una célula inmunitaria como se ha indicado anteriormente, que comprende:

65 (a) Proporcionar una célula inmunitaria,
(b) Introducir, en dicha célula, al menos un polinucleótido que codifique un receptor antigénico quimérico

específico de CD123 de la presente invención,
 (c) Introducir al menos otro receptor antigénico quimérico que no sea específico de CD123.

Además, se describe un método de tratamiento de un sujeto que lo necesite que comprende:

- 5
- (a) Proporcionar una célula inmunitaria que exprese, en la superficie, un receptor antigénico quimérico específico de CD123 según la invención;
 - (b) Administrar dichas células inmunitarias a dicho paciente.

10 Se desvela un método de tratamiento de un sujeto que lo necesite como se ha indicado anteriormente, en el que dicha célula inmunitaria la proporciona un donante.

Se desvela un método de tratamiento de un sujeto que lo necesite como se ha indicado anteriormente, en el que dicha célula inmunitaria la proporciona el propio paciente.

15 Receptores antigénicos quiméricos específicos de CD123

La presente invención se refiere a nuevos diseños del receptor antigénico quimérico (CAR) anti-CD123, que comprende un dominio de unión a ligando extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de transducción de señalización.

La expresión "dominio de unión a ligando extracelular", como se usa en el presente documento, se define como un oligo o polipéptido que es capaz de unirse a un ligando. Preferentemente, el dominio será capaz de interactuar con una molécula de la superficie celular. Por ejemplo, el dominio de unión a ligando extracelular puede seleccionarse para que reconozca un ligando que actúe como un marcador de superficie celular en células diana asociadas a una patología particular. En una realización preferida, dicho dominio de unión a ligando extracelular comprende un fragmento de anticuerpo monocatenario (scFv) que comprende el fragmento variable ligero (V_L) y el fragmento variable pesado (V_H) de un anticuerpo monoclonal anti CD-123 específico de antígeno diana interconectados por un enlazador flexible. Preferentemente, dichos V_L y V_H se seleccionan de los anticuerpos mencionados en la bibliografía, tales como 7G3, Old4, 26292, 32716, Klon43 y 12F1 como se indica en las Tablas 1 a 8, más preferentemente Old4, Klon43 y 12F1, e incluso más preferentemente, Klon43. Preferentemente, están unidos entre sí por un enlazador flexible que comprende la secuencia SEQ ID NO:10. En otras palabras, dichos CAR comprenden, preferentemente, un dominio de unión a ligando extracelular que comprende una secuencia polipeptídica que presenta al menos 90 %, 95 %, 97 % o 99 % de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en de la SEQ ID NO: 11 a la SEQ ID NO: 22 (véase la Tabla 2).

Más preferentemente, dichos CAR comprenden, preferentemente, un dominio de unión a ligando extracelular que comprende una secuencia polipeptídica que presenta al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98%, o 99% de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 13, 14, 19, 20 y de la SEQ ID NO: 21 a la SEQ ID NO: 22 e incluso más preferentemente dichos CAR comprenden, preferentemente, un dominio de unión a ligando extracelular que comprende una secuencia polipeptídica que presenta al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98% o 99% de identidad con las SEQ ID NO: 19 y 20, respectivamente.

Aún más preferentemente, dichos CAR comprenden un dominio de unión a ligando extracelular que comprende una secuencia polipeptídica que presenta al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 22 e incluso más preferentemente dichos CAR comprenden, preferentemente, un dominio de unión a ligando extracelular que comprende una secuencia polipeptídica que presenta al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con las secuencias de aminoácidos que consisten en SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO:19 y SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 20.

La expresión "anticuerpo recombinante", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo o a un fragmento de anticuerpo que se genera utilizando tecnología de ADN recombinante, tal como, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo expresado por un bacteriófago, un sistema de expresión de levadura o un sistema de expresión de células de mamífero. La expresión también debe interpretarse como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se ha generado mediante la síntesis de una molécula de ADN que codifica el anticuerpo o fragmento de anticuerpo y qué molécula de ADN expresa un anticuerpo o una proteína de un fragmento de anticuerpo, o una secuencia de aminoácidos que especifica el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, donde la secuencia de ADN o de aminoácidos se ha obtenido utilizando tecnología de secuencias de aminoácidos o ADN recombinante o sintética que está disponible y que es muy conocida en la técnica.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "modificaciones de secuencia conservativas" o

"humanización" pretenden referirse a modificaciones de aminoácidos que no afectan ni alteran significativamente las características de unión del CAR y/o que no afectan significativamente a la actividad del CAR que contiene la secuencia de aminoácidos modificada y que reducen o anulan una respuesta de anticuerpos humanos antimurinos (HAMA, *human anti-mouse antibody*). Dichas modificaciones conservativas incluyen sustituciones, adiciones y

5 delecciones de aminoácidos en dicho fragmento de anticuerpo en dicho CAR y/o en cualquier otra parte de dicha molécula CAR. Se pueden introducir modificaciones en un anticuerpo, en un fragmento de anticuerpo o en cualquier otra parte de la molécula CAR de la invención mediante técnicas estándar conocidas en la materia, tales como mutagénesis dirigida, mutagénesis mediada por PCR o empleando secuencias de línea germinal optimizadas.

10 Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es una en la que el resto de aminoácido se reemplaza por un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína,

15 triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por tanto, uno o más restos de aminoácidos dentro de un CAR de la invención pueden reemplazarse por otros restos de aminoácidos de la misma familia de cadenas laterales y el CAR alterado puede someterse a ensayo para determinar la capacidad de unirse a CD 123

20 utilizando los ensayos funcionales descritos en el presente documento.

El dominio de transducción de señal o dominio de señalización intracelular de un CAR según de la presente invención es responsable de la señalización intracelular después de la unión del dominio de unión a ligando extracelular con la diana dando como resultado la activación de la célula inmunitaria y de la respuesta inmunitaria.

25 En otras palabras, el dominio de transducción de señal es responsable de la activación de al menos una de las funciones efectoras normales de la célula inmunitaria en la que se expresa el CAR. Por ejemplo, la función efectora de un linfocito T puede ser una actividad citolítica o actividad auxiliar que incluye la secreción de citocinas. Por tanto, la expresión "dominio de transducción de señal" se refiere a la parte de una proteína que transduce la señal efectora a señal funcional y dirige la célula para realizar una función especializada.

30 Los ejemplos preferidos de dominio de transducción de señal para su uso en un CAR pueden ser las secuencias citoplasmáticas del receptor y correceptores de linfocitos T que actúan al unísono para iniciar la transducción de señal después de la interacción con el receptor antigénico, así como cualquier derivado o variante de estas secuencias y cualquier secuencia sintética que tenga la misma capacidad funcional. El dominio de transducción de

35 señal comprende dos clases distintas de secuencia de señalización citoplasmática, la que inician la activación primaria dependiente de antígeno y las que actúan de una manera dependiente de antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora. La secuencia de señalización citoplasmática primaria puede comprender motivos de señalización que se conocen como motivos de activación de inmunorreceptores basados en tirosina (ITAM, por las siglas del inglés *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs*). Los ITAM son motivos de señalización bien

40 definidos que se encuentran en la cola intracitoplasmática de una diversidad de receptores que actúan como sitios de unión de tirosina cinasas de clase syk/zap70. Los ejemplos de ITAM utilizados en la invención pueden incluir, como ejemplos no limitantes, los precedentes de TCRzeta, FcRgamma, FcRbeta, FcRepsilon, CD3 gamma, CD3delta, CD3epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. En una realización preferida, el dominio de transducción de señalización del CAR comprende el dominio de señalización CD3zeta que tiene una secuencia de

45 aminoácidos con al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 9.

50 El dominio de transducción de señales del CAR de la presente invención comprende una molécula señal coestimuladora. Una molécula coestimuladora es una molécula de superficie celular distinta de un receptor antigénico o sus ligandos que es necesaria para una respuesta inmunitaria eficaz. "Ligando coestimulador" se refiere a una molécula en una célula presentadora de antígenos que se une específicamente con una molécula coestimuladora afín en un linfocito T, proporcionando de este modo una señal que, además de la señal primaria proporcionada, por ejemplo, a través de la unión de un complejo de TCR/CD3 con una molécula del MHC cargada con péptido, actúa como mediadora en una respuesta de linfocitos T, incluyendo, pero sin limitación, activación de

55 proliferación, diferenciación y similares. Un ligando coestimulador puede incluir, pero sin limitación, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, un ligando coestimulador inducible (ICOS-L), una molécula de adhesión intercelular (ICAM, CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, M1CB, HVEM, receptor de linfotóxina beta, 3/TR6, ILT3, ILT4, un agonista o anticuerpo que se une al receptor de ligando Toll y un ligando que se une específicamente con B7-H3. Un ligando coestimulador también incluye, entre otros, un anticuerpo que se une específicamente a una molécula coestimuladora presente en un linfocito T, tal como, pero sin limitación, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno 1 asociado a la función de linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LTGHT, NKG2C, B7-H3, un ligando que se une específicamente con CD83. Una "molécula coestimuladora" se refiere al compañero de unión afín en un linfocito T que se une específicamente con un ligando coestimulador,

60 actuando así como mediadora en una respuesta coestimuladora en la célula, tal como, pero sin limitación, proliferación. Las moléculas coestimuladoras incluyen, pero sin limitación, una molécula del MHC de clase I, BTLA y

un receptor de ligando de Toll. Los ejemplos de moléculas coestimuladoras incluyen CD27, CD28, CD8, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno 1 asociado a la función de linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 y un ligando que se une específicamente con CD83 y similares.

5 En una realización preferida, el dominio de transducción de señal del CAR de la presente invención comprende una parte de molécula señal coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en el fragmento de 4-1BB (GenBank: AAA53133.) y CD28 (NP_006130.1). En particular, el dominio de transducción de señales del CAR de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 90 %, 95 %, 97 % o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 8.

10 Un CAR según la presente invención se expresa en la membrana superficial de la célula. Por tanto, dicho CAR comprende además un dominio transmembrana. Las características distintivas de dominios transmembrana apropiados, comprenden la capacidad para expresarse en la superficie de una célula, preferentemente, en la presente invención, una célula inmunitaria, en particular células linfocíticas o linfocitos citotóxicos naturales (NK, *Natural Killer*), y para interactuar entre sí para dirigir la respuesta celular de células inmunitarias contra una célula diana predefinida. El dominio transmembrana puede proceder de una fuente natural o sintética. El dominio transmembrana puede proceder de cualquier proteína unida a membrana o transmembrana. Como ejemplos no limitantes, el polipéptido transmembrana puede ser una subunidad del receptor de linfocitos T, tal como α , β , y γ o δ , un polipéptido que constituye el complejo de CD3, el receptor p55 (cadena α), p75 (cadena β) de IL-2, o cadena γ , cadena subunitaria de receptores de Fc, en particular proteínas del receptor de Fc γ III o CD. Como alternativa, el dominio transmembrana puede ser sintético y puede comprender restos tales como leucina y valina, predominantemente hidrófobos. En una realización preferida, dicho dominio transmembrana del CAR de la presente invención procede de la cadena CD8 alfa humana (por ejemplo, NP_001139345.1). El dominio transmembrana comprende además una región bisagra entre dicho dominio de unión a ligando extracelular y dicho dominio transmembrana. La expresión "región bisagra" utilizada en el presente documento, significa en general cualquier oligo o polipéptido que actúe para unir el dominio transmembrana con el dominio de unión a ligando extracelular. En particular, la región bisagra se utiliza para proporcionar más flexibilidad y accesibilidad al dominio de unión a ligando extracelular. Una región bisagra puede comprender hasta 300 aminoácidos, preferentemente de 10 a 100 aminoácidos y lo más preferentemente de 25 to 50 aminoácidos. La región bisagra puede proceder de toda o de parte de las moléculas de origen natural, tal como de toda o de parte de la región extracelular de CD8, CD4 o CD28, o de toda o de parte de una región constante de anticuerpo. Como alternativa, la región bisagra puede ser una secuencia sintética que corresponde a una secuencia bisagra de origen natural o puede ser una secuencia bisagra completamente sintética. En una realización preferida, dicho dominio bisagra del CAR de la presente invención comprende una parte de la cadena CD8 alfa humana, del receptor Fc γ RIII α o IgG1, respectivamente, mencionados en esta memoria descriptiva como SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO:5, o polipéptidos bisagra que presentan, preferentemente, una identidad de secuencia de al menos 80 %, más preferentemente de al menos 90 %, 95 %, 97 % o 99 % con estos polipéptidos.

40 Un CAR según la invención, generalmente comprende además un dominio transmembrana (TM), más particularmente seleccionado de CD8 α y 4-1BB, que muestra identidad con el polipéptido de SEQ ID NO: 6 o 7.

En una realización preferida, un CAR según la invención comprende además un dominio TM de CD8 α con SEQ ID NO: 6 o que muestra una identidad de secuencia de al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98% o 99% con la SEQ ID NO: 6.

45 En células cancerosas se observa habitualmente regulación negativa o mutación de antígenos diana, creando variantes de escape de pérdida de antígeno. Por tanto, para compensar el escape tumoral y hacer que las células inmunitarias sean más específicas contra la diana, el CAR específica de CD123 según la invención puede comprender otros dominios de unión a ligando extracelular, para unir simultáneamente diferentes elementos en la diana aumentando de este modo la activación y la función de las células inmunitarias. En una realización, los dominios de unión a ligando extracelular pueden colocarse en tándem en el mismo polipéptido transmembrana y opcionalmente pueden separarse por un enlazador. En otra realización, dichos dominios de unión a ligando extracelular diferentes pueden colocarse en diferentes polipéptidos transmembrana que componen el CAR. En otra realización, la presente invención se refiere a una población de CAR que comprenden, cada uno de ellos, diferentes dominios de unión a ligando extracelular. En particular, la presente invención se refiere a un método de modificación por ingeniería genética de células inmunitarias que comprende proporcionar una célula inmunitaria y expresar, en la superficie de dicha célula, una población de CAR que comprenden, cada uno de ellos, diferentes dominios de unión a ligando extracelular. En otra realización particular, la presente invención se refiere a un método de modificación por ingeniería genética de una célula inmunitaria que comprende proporcionar una célula inmunitaria e introducir, en dicha célula, polinucleótidos que codifiquen polipéptidos que componen una población de CAR que comprenden, cada uno de ellos, diferentes dominios de unión a ligando extracelular. Por población de CAR, se entiende al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis o más CAR, que comprenden, cada uno de ellos, diferentes dominios de unión a ligando extracelular. Los diferentes dominios de unión a ligando extracelular según la presente invención, pueden unir simultáneamente de forma preferente diferentes elementos en la diana aumentando de este modo la activación y función de células inmunitarias. La presente invención también se refiere a una célula inmunitaria aislada que comprende una población de CAR que comprenden, cada uno de ellos, diferentes dominios de unión a ligando

extracelular.

5 En una realización preferida, un CAR según la invención, comprende un polipéptido de SEQ ID NO: 19 y/o un polipéptido de SEQ ID NO: 20, más preferentemente, un CAR según la invención comprende un polipéptido con una identidad de al menos 80 %, preferentemente una identidad de 80 % a 99 % con la SEQ ID NO: 19 y/o un polipéptido que tiene una identidad de 80 a 99 % con la SEQ ID NO: 20. Incluso más preferentemente, un CAR según la invención comprende un polipéptido que tiene una identidad de 85 a 99 % con un polipéptido de SEQ ID NO: 19 y/o SEQ ID NO: 20.

10 En una realización más preferida, un CAR según la invención comprende un polipéptido que tiene las siguientes secuencias:

EVKLVESGGGLVQPGGSLSLSCAASGFTFTDYMSWVRQPPGKALEWLALIRSKADGYTTEYSASVKGRF

TLSRDDSQSILYLQMNALRPEDSATYYCARDAAAYSSYSPGAMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO. 19)

y

MADYKDIVMTQSHKFMSTSVGDRVNITCKASQNVDSAVAWYQQKPGQSPKALIYSASYRYSVGPDRFT

GRGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQYYSTPWTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO. 20).

15 En una realización preferida, un CAR según la invención comprende al menos un polipéptido que tiene la siguiente secuencia:

EVKLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTDYMSWVRQAPGKGLEWVGLIRSKADGYTTEYSASVKGRF

TISRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAVYYCARDAAAYSSYSPGAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO. 60),

20 En una realización preferida, un CAR según la invención comprende un polipéptido que tiene la siguiente secuencia:

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTDYMSWVRQAPGKGLEWVGLIRSKADGYTTEYSASVKGR

FTISRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAVYYCARDAAAYSSYSPGAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO.61)

En una realización preferida, un CAR según la invención comprende un polipéptido que tiene la siguiente secuencia:

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTDYMSWVRQAPGKGLEWVGLIRSKADGYTTEYSASVKGR

FTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCARDAAAYSSYSPGAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO. 62)

25 En una realización preferida, un CAR según la invención comprende un polipéptido que tiene la siguiente secuencia:

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTDYMSWVRQAPGKGLEWVGFIRSKADGYTTEYSASVKGR

FTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCARDAAAYSSYSPGAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO. 63)

30 En una realización preferida, un CAR según la invención comprende un polipéptido que tiene la siguiente secuencia:

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTDYMSWVRQAPGKGLEWVGFIRSKADGYTTEYAASVKGR

FTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCARDAAAYSSYSPGAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO. 64)

En una realización preferida, un CAR según la invención comprende un polipéptido que tiene la siguiente secuencia:

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTDYMSWVRQAPGKGLEWVGLIRSKADGYTTEYAASVKGR

35 FTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCARDAAAYSSYSPGAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO. 65)

En una realización preferida, un CAR según la invención comprende un polipéptido que tiene la siguiente secuencia:

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTDYMSWVRQAPGKGLEWVGFIRSKADGYTTEYAASVKGR
FTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRDAAYSYYSPEGAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO.
66).

En una realización preferida, un CAR según la invención comprende un polipéptido que tiene la siguiente secuencia:

MADYKDIVMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQNVDSAVAWYQQKPGKAPKALIYSASYRYSGVPSRFSG
RSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYYSTPWTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO. 54)

5

En una realización preferida, un CAR según la invención comprende un polipéptido que tiene la siguiente secuencia:

MADYKDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQNVDSAVAWYQQKPGKAPKALIYSASYRYSGVPSRFSG
RSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYYSTPWTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO. 55)

10

En una realización preferida, un CAR según la invención comprende un polipéptido que tiene la siguiente secuencia:

MADYKDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQNVDSAVAWYQQKPGKAPKALIYSASYRYSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYYSTPWTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO. 56)

15

En una realización preferida, un CAR según la invención comprende un polipéptido que tiene la siguiente secuencia:

MADYKDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQNVDSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYYSTPWTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO. 57),

20

En una realización preferida, un CAR según la invención comprende un polipéptido que tiene la siguiente secuencia:

MADYKDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQNVDSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRQSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYYSTPWTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO. 58),

En una realización preferida, un CAR según la invención comprende un polipéptido que tiene la siguiente secuencia:

MADYKDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQNVDSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYGQSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYYSTPWTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO. 59)

25

En una realización preferida, un CAR según la invención comprende al menos un polipéptido seleccionado de las siguientes secuencias:

EVKLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTDYMSWVRQAPGKGLEWVGLIRSKADGYTTEYSASVKGRF
TISRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAVYYCARDAAAYSYYSPEGAMDYWGQGLTVTVSS,

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTDYMSWVRQAPGKGLEWVGLIRSKADGYTTEYSASVKGR
FTISRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAVYYCARDAAAYSYYSPEGAMDYWGQGLTVTVSS,

30

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTDYMSWVRQAPGKGLEWVGLIRSKADGYTTEYSASVKGR
FTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCARDAAAYSYSPGAMDYWGQGTLTVSS,
EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTDYMSWVRQAPGKGLEWVGFIRSKADGYTTEYSASVKGR
FTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCARDAAAYSYSPGAMDYWGQGTLTVSS,
EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTDYMSWVRQAPGKGLEWVGFIRSKADGYTTEYAASVKGR
FTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCARDAAAYSYSPGAMDYWGQGTLTVSS,
EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTDYMSWVRQAPGKGLEWVGLIRSKADGYTTEYAASVKGR
FTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCARDAAAYSYSPGAMDYWGQGTLTVSS and
EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTDYMSWVRQAPGKGLEWVGFIRSKADGYTTEYAASVKGR
FTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRDAAYSYSPGAMDYWGQGTLTVSS

y al menos una secuencia seleccionada de las siguientes secuencias

MADYKDIVMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQNVDSAAVAWYQQKPGKAPKALIYSASYRYSYGVPSRFSG
RSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYSTPWTFGGQGTKVEIKR,
MADYKDIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQNVDSAAVAWYQQKPGKAPKALIYSASYRYSYGVPSRFSG
RSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYSTPWTFGGQGTKVEIKR,
MADYKDIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQNVDSAAVAWYQQKPGKAPKALIYSASYRYSYGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYSTPWTFGGQGTKVEIKR,
MADYKDIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQNVDSAAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYSYGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYSTPWTFGGQGTKVEIKR,
MADYKDIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQNVDSAAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYSYGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYSTPWTFGGQGTKVEIKR and
MADYKDIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQNVDSAAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYGQSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYSTPWTFGGQGTKVEIKR.

5

En una realización preferida, un CAR según la invención comprende un polipéptido seleccionado de las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, y SEQ ID NO: 66.

10

En una realización más preferida, un CAR según la invención comprende un polipéptido seleccionado de las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59 y un polipéptido seleccionado de las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, y SEQ ID NO: 66.

15

En una realización, un CAR según la invención comprende un polipéptido seleccionado de la lista que consiste en SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44 y SEQ ID NO: 46, preferentemente un CAR que comprende 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con un polipéptido de SEQ ID NO: 42, un CAR que comprende 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con un

20

polipéptido de SEQ ID NO: 44 y un CAR que comprende 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con un polipéptido de SEQ ID NO: 46.

5 En una realización más preferida, un CAR según la invención comprende un polipéptido que comprende 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con SEQ ID NO: 1+ SEQ ID NO: 42.

10 En otra realización preferida, un CAR según la invención comprende un polipéptido de SEQ ID NO: 10 + SEQ ID NO: 42, aún más preferentemente un CAR que comprende 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con SEQ ID NO: 10 + SEQ ID NO: 42, en particular, un CAR que comprende de 85 % a 99 % de identidad con SEQ ID NO: 10 + SEQ ID NO: 42.

15 En una realización más preferida, un CAR según la invención comprende un polipéptido que comprende 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con SEQ ID NO: 1+ SEQ ID NO: 44.

20 En una realización aún más preferida, un CAR según la invención comprende un polipéptido de SEQ ID NO: 10 + SEQ ID NO: 44, aún más preferentemente un CAR que comprende 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con SEQ ID NO: 10 + SEQ ID NO: 44, en particular, un CAR que comprende de 85 % a 99 % de identidad con SEQ ID NO: 10 + SEQ ID NO: 44.

25 En una realización más preferida, un CAR según la invención comprende un polipéptido que comprende 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 46.

30 En una realización aún más preferida, un CAR según la invención comprende un polipéptido de SEQ ID NO: 10 + SEQ ID NO: 46, aún más preferentemente un CAR que comprende 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con SEQ ID NO: 10 + SEQ ID NO: 46, en particular, un CAR que comprende de 85 % a 99 % de identidad con SEQ ID NO: 10 + SEQ ID NO: 46.

35 En otra realización preferida, un CAR según la invención consta de un polipéptido de SEQ ID NO: 1+ SEQ ID NO: 10 + SEQ ID NO: 42, aún más preferentemente un CAR que consiste en 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con SEQ ID NO: SEQ ID NO: 1+ SEQ ID NO:10 + SEQ ID NO: 42.

40 En otra realización preferida, un CAR según la invención consta de un polipéptido de SEQ ID NO: SEQ ID NO: 1+ SEQ ID NO:10 + SEQ ID NO: 44 aún más preferentemente un CAR que consiste en 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con SEQ ID NO: SEQ ID NO: 1+ SEQ ID NO:10 + SEQ ID NO: 44.

45 En otra realización preferida, un CAR según la invención consta de un polipéptido de SEQ ID NO: SEQ ID NO: 1+ SEQ ID NO:10 + SEQ ID NO: 46 aún más preferentemente un CAR que consiste en 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con SEQ ID NO: SEQ ID NO: 1+ SEQ ID NO:10 + SEQ ID NO: 46.

50 Según la invención, las células inmunitarias que expresan el CAR anti-CD123 de la invención desencadenan una respuesta inmunitaria contra el cáncer. En una realización preferida, las células inmunitarias que expresan el CAR de la invención, dotadas del CAR anti-CD123 de la invención, desencadenan una respuesta inmunitaria que no comprende una respuesta de anticuerpos humanos antimurinos (HAMA).

55 Según la invención, se puede administrar una cantidad eficaz de la célula inmunitaria modificada por ingeniería genética a un paciente que lo necesite al menos una vez, dos veces, o varias veces, sola o en combinación con otro tratamiento.

Polinucleótidos, vectores:

60 La presente invención también se refiere a polinucleótidos, a vectores que codifican el CAR descrito anteriormente según la invención.

65 El polinucleótido puede consistir en un casete de expresión o vector de expresión (por ejemplo, un plásmido para la introducción en una célula hospedadora bacteriana, o un vector vírico, tal como un vector de baculovirus para la transfección de una célula hospedadora de insecto, o un plásmido o un vector vírico, tal como un lentivirus para la transfección de una célula hospedadora de mamífero).

En una realización particular, las diferentes secuencias de ácido nucleico pueden incluirse en un polinucleótido o vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de salto ribosómico, tal como una secuencia que codifica un péptido 2A. Los péptidos 2A, que se identificaron en el subgrupo de Aftovirus de los picornavirus, causa un "salto" ribosómico de un codón al siguiente sin la formación de un enlace peptídico entre los dos aminoácidos codificados por los codones (véase (Donnelly y Elliott 2001; Atkins, Wills et al. 2007; Doronina, Wu et al. 2008)). Por "codón" se entiende tres nucleótidos en un ARNm (o en la cadena en sentido de una molécula de ADN) que un ribosoma traduce en un resto de aminoácido. Por tanto, a partir de un solo marco de lectura abierto contiguo dentro de un ARNm, pueden sintetizarse dos polipéptidos cuando los polipéptidos están separados por una secuencia oligopeptídica 2A que está en marco. Dichos mecanismos de salto ribosómico son muy conocidos en la técnica y se sabe varios vectores los utilizan para la expresión de varias proteínas codificadas por un solo ARN mensajero.

Para dirigir el polipéptido transmembrana a la ruta secretora de una célula hospedadora, en la secuencia de polinucleótidos o secuencia vectorial se proporciona una secuencia señal secretora (también conocida como secuencia líder, secuencia prepro o secuencia pre). La secuencia señal secretora está unida operativamente a la secuencia de ácidos nucleicos transmembrana, es decir, las dos secuencias están interconectadas en el marco de lectura correcto y se colocan para dirigir el polipéptido recién sintetizado en la ruta secretora de la célula hospedadora. las secuencias señal secretoras se colocan comúnmente en 5' respecto a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido de interés, aunque ciertas secuencias señal secretoras pueden colocarse en otros lugares de la secuencia de ácidos nucleicos de interés (véase, por ejemplo, Welch et al., patente de Estados Unidos Nº 5 037 743; Holland et al., patente de Estados Unidos Nº 5 143 830). En una realización preferida, el péptido señal comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 y 2 o al menos una con 90 %, 95 %, 97 % o 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 y/o 2.

Los expertos en la materia reconocerán que, dada la degeneración del código genético, es posible que entre estas moléculas polinucleotídicas haya una variación de secuencia considerable. Preferentemente, las secuencias de ácido nucleico de la presente invención están optimizadas con codones para la expresión en células de mamífero, preferentemente para la expresión en células humanas. La optimización con codones se refiere al intercambio de codones en una secuencia de interés que son generalmente raros en genes altamente expresados de una especie dada por codones que son generalmente frecuentes en genes altamente expresados de dicha especie, codificando dichos codones los aminoácidos como los codones que se están intercambiando.

Células

La célula según la presente invención, se refiere a una célula de origen hematopoyético implicada funcionalmente en el inicio y/o ejecución de la respuesta inmunitaria innata y/o adaptativa. La célula según la presente invención es, preferentemente, un linfocito T obtenido de un donante. Dicho linfocito T según la presente invención, puede proceder de una célula madre. Las células madre pueden ser células madre adultas, células madre embrionarias, más particularmente, células madre no humanas, células madre de sangre del cordón umbilical, células progenitoras, células madre de médula ósea, células madre totipotentes no humanas o células madre hematopoyéticas. En una realización preferida, las células son células humanas, en particular células madre humanas.

Las células madre humanas representativas son células CD34+. Dicha célula aislada también puede ser una célula dendrítica, una célula dendrítica destructora, un mastocito, un linfocito citolítico natural (NK, *natural killer*), un linfocito B o un linfocito T seleccionada del grupo que consiste en linfocitos T inflamatorios, linfocitos T citotóxicos, linfocitos T reguladores o linfocitos T auxiliares. En otra realización, dicha célula puede proceder del grupo que consiste en linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+. Antes de la expansión y modificación genética de las células de la invención, a través de una variedad de métodos no limitativos puede obtenerse una fuente de células de un sujeto. Las células pueden obtenerse de diversas fuentes no limitantes, incluyendo células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de ganglios linfáticos, sangre de cordón umbilical, tejido del timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, derrame pleural, tejido del bazo, y tumores. En determinadas realizaciones de la presente invención, puede utilizarse cualquier número de líneas de linfocitos T disponibles y conocidas por los expertos en la materia. En otra realización, dicha célula procede, preferentemente, de un donante sano. En otra realización, dicha célula forma parte de una población mixta de células que presentan características fenotípicas diferentes.

El aislamiento y la preparación de células madre no requieren la destrucción de al menos un embrión humano. Las células inmunitarias pueden originarse en el paciente, dada la operativa de tratamientos autólogos, o de donantes dada la producción de células alogénicas, que puede utilizarse en tratamientos alogénicos.

Más preferentemente la célula inmunitaria de la invención expresa un CAR anti-CD123 correspondiente a SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44 o SEQ ID NO: 46, incluso más preferentemente la célula inmunitaria de la invención expresa un CAR anti-CD123 humanizado correspondiente a SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44 o SEQ ID NO: 46 humanizadas.

Métodos de modificación por ingeniería genética de células inmunitarias dotadas de los CAR:

La presente invención incluye el método de preparación de células inmunitarias para inmunoterapia, que comprende introducir *ex vivo*, en dichas células inmunitarias, los polinucleótidos o vectores que codifican el CAR CD123, como se describió anteriormente en los documentos WO2014/130635, WO2013/176916 y WO2013/176915.

5 En un ejemplo preferido, dichos polinucleótidos se incluyen en vectores de lentivirus dado que se expresan de manera estable en las células inmunitarias.

10 Según ejemplos adicionales, dicho método comprende además la etapa de modificar genéticamente dichas células para hacerlas más adecuadas para el trasplante alogénico.

Modificación de linfocitos T inactivando al menos un gen que codifica un componente del receptor de linfocitos T (TCR).

15 Según un primer aspecto, la célula inmunitaria puede hacerse menos alogénica, por ejemplo, inactivando al menos un gen que exprese uno o más componentes del receptor de linfocitos T (TCR, del inglés *T-cell receptor*) como se describe en el documento WO 2013/176915, que se puede combinar con la inactivación de un gen que codifica o regula la expresión de la proteína HLA o $\beta 2m$. En consecuencia, el riesgo de síndrome de injerto contra hospedador y el rechazo del injerto se reducen significativamente.

20 En consecuencia, cuando las células inmunitarias son linfocitos T, la presente divulgación también proporciona métodos para diseñar linfocitos T que sean menos alogénicos.

25 Los métodos para hacer que las células sean menos alogénicas pueden comprender la etapa de inactivar al menos un gen que codifica un componente del receptor de linfocitos T (TCR), en particular genes TCRalpha, TCRbeta.

30 En el documento WO2013/176915 se desvelan métodos para preparar células inmunitarias que expresen CAR, adecuadas para el trasplante alogénico, a través de la inactivación de uno o más componentes del receptor de linfocitos T (TCR).

35 La presente invención incluye una célula inmunitaria que expresa CAR anti-CD123 en la que al menos un gen que expresa uno o más componentes del receptor de linfocitos T (TCR) se ha inactivado. Por tanto, la presente invención proporciona un linfocito T que expresa CAR anti-CD123 donde el CAR procede de Klon 43, que tiene, en particular, una identidad de al menos 80 % con la SEQ ID NO: 44 y en la que al menos un gen que expresa uno o más componentes del receptor de linfocitos T (TCR) está inactivado.

Según la invención, las células inmunitarias CAR anti-CD123 con uno o más componentes del receptor de linfocitos T (TCR) inactivados, pretenden utilizarse como un medicamento.

40 Al inactivar un gen TCR se pretende que el gen de interés no se exprese en una forma de proteína funcional. En realizaciones particulares, la modificación genética del método se basa en la expresión, en células proporcionadas para diseñar, de una endonucleasa de corte raro, de tal manera que dicha endonucleasa de corte raro cataliza específicamente la escisión en un gen diana inactivando de ese modo dicho gen diana. Las roturas de la cadena de ácido nucleico causadas por la endonucleasa de corte raro normalmente se reparan a través de los distintos mecanismos de recombinación homóloga o unión de extremos no homólogos (NHEJ, siglas del inglés *non-homologous end joining*). Sin embargo, la NHEJ es un proceso de reparación imperfecto que a menudo da como resultado cambios en la secuencia de ADN en el sitio de la escisión. Los mecanismos implican volver a conectar lo que queda de los dos extremos de ADN a través de religamiento directo (Critchlow y Jackson 1998) o a través de la denominada unión de extremos mediada por microhomología (Betts, Brenchley et al. 2003; Ma, Kim et al. 2003). La reparación a través de la unión de extremos no homólogos (NHEJ) a menudo da como resultado pequeñas inserciones o eliminaciones, y puede utilizarse para la creación de supresiones génicas específicas. Dicha modificación puede ser una sustitución, delección o adición de al menos un nucleótido. Las células en las que se ha producido un evento de mutagénesis inducida por escisión, es decir, un evento de mutagénesis consecutivo a un evento NHEJ, pueden identificarse y/o seleccionarse mediante un método bien conocido en la técnica. En una realización particular, la etapa de inactivar al menos un gen que codifica un componente del receptor de linfocitos T (TCR) en las células de cada muestra individual, comprende introducir en la célula una endonucleasa de corte raro capaz de alterar al menos un gen que codifica un componente del receptor de linfocitos T (TCR). En una realización más particular, dichas células de cada muestra individual se transforman con ácido nucleico que codifica una endonucleasa de corte raro capaz de alterar al menos un gen que codifica un componente del receptor de linfocitos T (TCR), y dicha endonucleasa de corte raro se expresa en dichas células.

65 Dicha endonucleasa de corte raro puede ser una meganucleasa, una nucleasa de dedo de zinc, una nucleasa CRISPR/Cas9, una nucleasa argonauta, una nucleasa TALE o una nucleasa MBBBD. En una realización preferida, dicha endonucleasa de corte raro es una nucleasa TALE. Por nucleasa TALE se entiende una proteína de fusión que consiste en un dominio de unión a ADN procedente de un efector de tipo activador de la transcripción (TALE, siglas del inglés *Transcription Activator Like Effector*) y en un dominio catalítico de nucleasa para escindir una secuencia

diana de ácido nucleico (Boch, Scholze et al. 2009; Moscou y Bogdanove 2009; Christian, Cermak et al. 2010; Cermak, Doyle et al. 2011; Geissler, Scholze et al. 2011; Huang, Xiao et al. 2011; Li, Huang et al. 2011; Mahfouz, Li et al. 2011; Miller, Tan et al. 2011; Morbitzer, Romer et al. 2011; Mussolino, Morbitzer et al. 2011; Sander, Cade et al. 2011; Tesson, Usal et al. 2011; Weber, Gruetzner et al. 2011; Zhang, Cong et al. 2011; Deng, Yan et al. 2012; Li, Piatek et al. 2012; Mahfouz, Li et al. 2012; Mak, Bradley et al. 2012). En la presente invención, se han diseñado nuevas nucleasas TALE para dirigir con precisión genes relevantes para estrategias de inmunoterapia adoptiva.

En el documento PCT/EP2014/075317 se describen nucleasas TALE preferidas que reconocen y escinden la secuencia diana. En particular, para aumentar la mutagénesis con el fin de potenciar su capacidad para inactivar genes dirigidos, puede introducirse, además, un dominio catalítico adicional en la célula con dicha endonucleasa de corte raro. Más particularmente, dicho dominio catalítico adicional es una enzima de procesamiento de ADN terminal. Los ejemplos no limitantes de enzimas de procesamiento de ADN terminal incluyen exonucleasas 5-3', exonucleasas 3-5', exonucleasas alcalinas 5-3', endonucleasas colgajo 5', helicasas, fosfatasa, hidrolasas y ADN polimerasas independientes de molde. Los ejemplos no limitantes de dicho dominio catalítico comprenden un dominio de proteína o un derivado catalíticamente activo del dominio de proteína seleccionado del grupo que consiste en hExol (EXO1_HUMAN), Exol de levadura (EXO1_YEAST), Exol de *E. coli*, TREX2 de ser humano, TREX1 de ratón, TREX1 de ser humano, TREX1 de bovino, TREX1 de rata, ADN2 humana TdT (desoxinucleotidil transferasa terminal), ADN2 de Levadura (DNA2_YEAST). En una realización preferida, dicho dominio catalítico adicional tiene una actividad 3'-5'-exonucleasa, y en una realización más preferida, dicho dominio catalítico adicional es TREX, más preferentemente el dominio catalítico es TREX2 (documento WO2012/058458). En otra realización preferida, dicho dominio catalítico está codificado por un polipéptido TREX2 monocatenario. Dicho dominio catalítico adicional puede fusionarse a una proteína de fusión nucleasa o proteína quimérica según la invención, opcionalmente mediante un enlazador peptídico.

Se sabe que las roturas endonucleolíticas estimulan la tasa de recombinación homóloga. Por tanto, en otra realización, la etapa de modificación genética del método comprende además una etapa de introducción, en las células, de un ácido nucleico exógeno que comprende al menos una secuencia homóloga en una parte de la secuencia de ácidos nucleicos diana, de modo que se produzca dicha recombinación homóloga entre la secuencia de ácidos nucleicos diana y el ácido nucleico exógeno. En realizaciones particulares, dicho ácido nucleico exógeno comprende una primera parte y una segunda parte que son homólogas a las regiones 5' y 3' de la secuencia de ácidos nucleicos diana, respectivamente. Dicho ácido nucleico exógeno en estas realizaciones también comprende una tercera parte colocada entre la primera y la segunda parte, que no comprende homología con las regiones 5' y 3' de la secuencia de ácidos nucleicos diana. Después de la escisión de la secuencia de ácidos nucleicos diana, se estimula un evento de recombinación homóloga entre la secuencia de ácidos nucleicos diana y el ácido nucleico exógeno. Preferentemente, dentro de dicha matriz donante, se utilizan secuencias homólogas de al menos 50 pb, preferentemente de más de 100 pb y más preferentemente de más de 200 pb. En una realización particular, la secuencia homóloga puede tener de 200 pb a 6 000 pb, más preferentemente de 1 000 pb a 2 000 pb. De hecho, las homólogas compartidas de ácidos nucleicos se localizan en regiones flanqueantes cadena arriba y cadena abajo del sitio de la rotura y la secuencia de ácidos nucleicos que se introducirá debe localizarse entre los dos brazos.

PUNTOS DE CONTROL INMUNITARIO

La presente invención proporciona linfocitos T alogénicos que expresan un anti-CD123, en particular un CAR anti-CD123 de SEQ ID NO: 44 o de SEQ ID NO: 1+ SEQ ID NO: 44, en donde al menos un gen que expresa uno o más componentes del receptor de linfocitos T (TCR) está inactivado y/o un gen seleccionado de los genes CTLA4, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, PDCD1, LAG3, HAVCR2, BTLA, CD160, TIG IT, CD96, CRTAM, LAIR1, SIGLEC7, SIGLEC9, CD244, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, TGFBRII, TGFBRI, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1 (orblimp1), BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2, GUCY1B3, se inactiva como se indica en el documento WO2014/184741.

Linfocitos T resistentes a fármacos

Según otro aspecto, el CAR anti-CD123 que expresa los linfocitos T de la invención, pueden modificarse por ingeniería genética para mejorar su resistencia a fármacos inmunosupresores o a tratamientos quimioterapéuticos, que se utilizan como norma asistencial para el tratamiento de células malignas positivas para CD123.

Varios agentes citotóxicos (fármacos contra el cáncer), tales como antimetabolitos, agentes alquilantes, antraciclinas, inhibidores de ADN metiltransferasa, compuestos de platino y venenos de huso, se han desarrollado para destruir a las células cancerosas. Sin embargo, la introducción de estos agentes con nuevas terapias, tales como inmunoterapias, es problemática. Por ejemplo, los agentes quimioterapéuticos pueden ser perjudiciales para el establecimiento de células inmunocompetentes antitumorales robustas debido a perfiles de toxicidad inespecíficos de los agentes. Las terapias basadas en moléculas pequeñas que se dirigen a las rutas de proliferación celular también pueden obstaculizar el establecimiento de inmunidad antitumoral. Si los regímenes de quimioterapia que son transitoriamente eficaces pueden combinarse con nuevas terapias de células inmunocompetentes, entonces podría lograrse una mejora significativa en la terapia antineoplásica (para una revisión (Dasgupta, McCarty et al.

2011)).

Para mejorar la terapia del cáncer y la injertación selectiva de linfocitos T alogénicos, a dichos linfocitos T alogénicos se les confiere resistencia a fármacos para protegerlos de los efectos secundarios tóxicos del agente
 5 quimioterapéutico. La resistencia a fármacos de los linfocitos T también permite su enriquecimiento *in vivo* o *ex vivo*, ya que los linfocitos T que expresan el gen de resistencia a fármacos sobrevivirán y se multiplicarán en relación con las células sensibles al fármaco.

En el documento PCT/EP2014/075317 se desvelan métodos de modificación por ingeniería genética de linfocitos T
 10 resistentes a agentes quimioterapéuticos.

En particular, la presente divulgación se refiere a un método de modificación por ingeniería genética de células alogénicas adecuadas para inmunoterapia en donde al menos un gen que codifica un componente del receptor de linfocitos T (TCR) está inactivado y un gen se modifica para conferir resistencia a un fármaco que comprende:

- 15 ○ Proporcionar un linfocito T que exprese un CAR anti-CD123; en particular, un linfocito T que exprese un CAR anti-CD123 de SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, preferentemente un CAR 123 humanizado de SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46
- 20 ○ Modificar dicho linfocito T que exprese un CAR anti-CD123 inactivando al menos un gen que codifique un componente del receptor de linfocitos T (TCR);
- Modificar dicho linfocito T que exprese un CAR anti-CD123 para conferir resistencia a un fármaco a dicho linfocito T que exprese un CAR anti-CD123;
- Expandir dicho linfocito T que exprese un CAR anti-CD123 modificado por ingeniería genética en presencia de dicho fármaco.

25 Como alternativa, la presente divulgación se refiere a un método que comprende:

- 30 ○ Proporcionar un linfocito T que exprese un CAR anti-CD123; en particular, un linfocito T que exprese un CAR anti-CD123 de SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, preferentemente un CAR 123 humanizado de SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46
- Modificar dicho linfocito T que exprese un CAR anti-CD123 para conferir resistencia a un fármaco a dicho linfocito T que exprese un CAR anti-CD123;
- Modificar dicho linfocito T que exprese un CAR anti-CD123 inactivando al menos un gen que codifique un componente del receptor de linfocitos T (TCR);
- 35 ○ Expandir dicho linfocito T que exprese un CAR anti-CD123 modificado por ingeniería genética en presencia de dicho fármaco.

En particular, la presente divulgación también se refiere a un método de modificación por ingeniería genética de células alogénicas adecuadas para inmunoterapia en donde al menos un gen que codifica un componente del receptor de linfocitos T (TCR) está inactivado y un gen se modifica para conferir resistencia a un fármaco que
 40 comprende:

- 45 ○ Proporcionar un linfocito T que exprese un CAR anti-CD123; en particular, linfocito T que exprese un CAR anti-CD123 de SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, preferentemente un CAR 123 humanizado de SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, más preferentemente un CAR 123 humanizado de SEQ ID NO: 75,
- Modificar dicho linfocito T que exprese un CAR anti-CD123 inactivando al menos un gen que codifique un componente del receptor de linfocitos T (TCR);
- 50 ○ Modificar dicho linfocito T que exprese un CAR anti-CD123 para conferir resistencia a un fármaco a dicho linfocito T que exprese un CAR anti-CD123;
- Expandir dicho linfocito T que exprese un CAR anti-CD123 modificado por ingeniería genética en presencia de dicho fármaco.

55 Como alternativa, la presente divulgación se refiere a un método que comprende:

- 60 ○ Proporcionar un linfocito T que exprese un CAR anti-CD123; en particular, un linfocito T que exprese un CAR anti-CD123 de SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, preferentemente un CAR 123 humanizado de SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, más preferentemente un CAR 123 humanizado de SEQ ID NO: 75,
- Modificar dicho linfocito T que exprese un CAR anti-CD123 para conferir resistencia a un fármaco a dicho linfocito T que exprese un CAR anti-CD123;
- Modificar dicho linfocito T que exprese un CAR anti-CD123 inactivando al menos un gen que codifique un componente del receptor de linfocitos T (TCR);

65 Expandir dicho linfocito T que exprese un CAR anti-CD123 modificado por ingeniería genética en presencia de dicho fármaco.

Expresión de genes de resistencia a fármacos en células inmunitarias que expresan un CAR anti-CD123

5 En una realización particular, dicha resistencia a fármacos puede conferirse a los linfocitos T mediante la expresión de al menos un gen de resistencia a fármacos. Dicho gen de resistencia a fármacos se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica "resistencia" a un agente, tal como un agente quimioterapéutico (por ejemplo, metotrexato). En otras palabras, la expresión del gen de resistencia a fármacos en una célula permite la proliferación de las células en presencia del agente en mayor medida que la proliferación de una célula correspondiente sin el gen de resistencia a fármacos. La expresión del gen de resistencia a fármacos en una célula permite la proliferación de las células en presencia del agente y no afecta a su actividad. Un gen de resistencia a fármacos de la invención puede codificar resistencia a antimetabolitos, metotrexato, vinblastina, cisplatino, agentes alquilantes, antraciclinas, antibióticos citotóxicos, antiinmunofilinas, sus análogos o derivados, y similares.

15 En una realización, un gen de resistencia a fármacos de la invención puede conferir resistencia a un fármaco (o a un agente), en particular a un fármaco contra el cáncer seleccionado de aracitina, arabinósido de citosina, amsacrina, daunorrubicina, idarrubicina, novantrona, mitoxantrona, vepesid, etopósido (VP16), *trioxido de arsénico*, *ácido transretinoico*, *combinación de trióxido de arsénico*, *ácido transretinoico*, mecloretamina, procarbazona, clorambucilo, citarabina, antraciclinas, 6-tioguanina, hidroxiaurea, prednisona, y combinaciones de las mismas.

20 Se han identificado varios genes de resistencia a fármacos que posiblemente pueden utilizarse para conferir resistencia a fármacos a células diana (Takebe, Zhao et al. 2001; Sugimoto, Tsukahara et al. 2003; Zielske, Reese et al. 2003; Nivens, Felder et al. 2004; Bardenheuer, Lehmborg et al. 2005; Kushman, Kabler et al. 2007).

25 Un ejemplo de un gen de resistencia a fármacos también puede ser una forma mutante o modificada de la dihidrofolato reductasa (DHFR). La DHFR es una enzima implicada en la regulación de la cantidad de tetrahidrofolato en la célula y es esencial para la síntesis de ADN. Análogos de folato, tal como metotrexato (MTX), inhiben la DHFR y, por lo tanto, se utilizan como agentes antineoplásicos en el ámbito clínico. Se han descrito diferentes formas mutantes de DHFR que tienen mayor resistencia a la inhibición por los antifolatos utilizados en la terapia. En una realización particular, el gen de resistencia a fármacos según la presente invención puede ser una secuencia de ácidos nucleicos que codifique una forma mutante de la DHFR de tipo silvestre humana (GenBank: AAH71996.1) que comprenda al menos una mutación que confiera resistencia a un tratamiento con antifolato, tal como metotrexato. En una realización en particular, la forma mutante de la DHFR comprende al menos un aminoácido mutado en la posición G15, L22, F31 o F34, preferentemente en las posiciones L22 o F31 (Schweitzer, Dicker et al. 1990); solicitud internacional W094/24277; patente de Estados Unidos US 6 642 043). En una realización particular, dicha forma mutante de la DHFR comprende dos aminoácidos mutados en las posiciones L22 y F31. La correspondencia de las posiciones de aminoácidos descritas en el presente documento se expresa con frecuencia en términos de las posiciones de los aminoácidos de la forma del polipéptido de la DHFR de tipo silvestre expuestas en GenBank: AAH71996.1. En una realización particular, el resto de serina en la posición 15 se reemplaza preferentemente con un resto de triptófano. En otra realización particular, el resto de leucina en la posición 22 se reemplaza preferentemente con un aminoácido que alterará la unión de la DHFR mutante con antifolatos, preferentemente con restos de aminoácidos no cargados, tales como fenilalanina o tirosina. En otra realización particular, el resto de fenilalanina en las posiciones 31 o 34 se reemplaza preferentemente con un pequeño aminoácido hidrófilo tal como alanina, serina o glicina.

45 Como se usa en el presente documento, un "agente antifolato" o "análogos de folato" se refiere a una molécula dirigida a interferir con la ruta metabólica del folato en algún nivel. Los ejemplos de agentes antifolato incluyen, por ejemplo, metotrexato (MTX); aminopterina; trimetrexato (Neutrexin™); edatrexato; ácido N10-propargil-5,8-dideazafólico (CB3717); ZD1694 (Tumodex), ácido 5,8-dideazaisofólico (IAHQ); ácido 5,10-dideazatetrahidrofólico (DDATHF); ácido 5-deazafólico; PT523 (N alfa-(4-amino-4-desoxipteroil)-N delta-hemifaloi-L-ornitina); 10-etil-10-deazaaminopterina (DDATHF, lomatrexol); piritrexim; 10-EDAM; ZD1694; GW1843; pemetrexato y PDX (10-propargil-10-deazaaminopterina).

Otro ejemplo de un gen de resistencia a fármacos también puede ser una forma mutante o modificada de la ionisina-5'-monofosfato deshidrogenasa II (IMPDH2), una enzima limitante de la velocidad en la síntesis *de novo* de nucleótidos de guanosina. La forma mutante o modificada de la IMPDH2 es un gen de resistencia a inhibidores de la IMPDH. Los inhibidores de la IMPDH pueden ser el ácido micofenólico (MPA) o su profármaco mofetilo micofenolato (MMF). La IMPDH2 mutante puede comprender al menos una, preferentemente dos mutaciones en el sitio de unión a MAP de la IMPDH2 humana de tipo silvestre (NP_000875.2) que conducen a una resistencia significativamente mayor a inhibidores de la IMPDH. Las mutaciones están preferentemente en las posiciones T333 y/o S351 (Yam, Jensen et al. 2006; Sangiolo, Lesnikova et al. 2007; Jonnalagadda, Brown et al. 2013). En una realización particular, el resto de treonina en la posición 333 se reemplaza con un resto de isoleucina y el resto de serina en la posición 351 se reemplaza con un resto de tirosina. La correspondencia de las posiciones de aminoácidos descritas en el presente documento se expresa con frecuencia en términos de las posiciones de los aminoácidos de la forma del polipéptido de la IMPDH2 humana de tipo silvestre expuesta en NP_000875.2.

65 Otro gen de resistencia a fármacos es la forma mutante de la calcineurina. La calcineurina (PP2B), una

serina/treonina proteína fosfatasa expresada de forma ubicua que participa en muchos procesos biológicos y que es fundamental para la activación de linfocitos T. La calcineurina es un heterodímero compuesto por una subunidad catalítica (CnA; tres isoformas) y una subunidad reguladora (CnB; dos isoformas). Después de la participación del receptor de linfocitos T, la calcineurina desfosforila el factor de transcripción NFAT, lo que le permite translocarse al núcleo y activar al gen diana clave activo, tal como IL2. FK506 en complejo con FKBP12, o ciclosporina A (CsA) en complejo con CyPA bloquean el acceso de NFAT al sitio activo de la calcineurina, impidiendo su desfosforilación e inhibiendo por lo tanto la activación de linfocitos T (Brewin, Mancao et al. 2009). El gen de resistencia a fármacos de la presente invención puede ser una secuencia de ácidos nucleicos que codifique una forma mutante de calcineurina resistente a un inhibidor de calcineurina tal como FK506 y/o CsA. En una realización particular, dicha forma mutante puede comprender al menos un aminoácido mutado del heterodímero de calcineurina de tipo silvestre en las posiciones: V314, Y341, M347, T351, W352, L354, K360, preferentemente mutaciones dobles en las posiciones T351 y L354 o V314 e Y341. En una realización particular, el resto de valina en la posición 341 puede reemplazarse con un resto de lisina o arginina, el resto de tirosina en la posición 341 puede reemplazarse con un resto de fenilalanina; la metionina en la posición 347 puede reemplazarse con el resto de ácido glutámico, arginina o triptófano; la treonina en la posición 351 puede reemplazarse con el resto de ácido glutámico; el resto de triptófano en la posición 352 puede reemplazarse con un resto de cisteína, ácido glutámico o alanina, la serina en la posición 353 puede reemplazarse con un resto de histidina o asparagina, la leucina en la posición 354 puede reemplazarse con un resto de alanina; la lisina en la posición 360 puede reemplazarse con un resto de alanina o fenilalanina de una secuencia correspondiente a GenBank: ACX34092.1. La correspondencia de las posiciones de aminoácidos descritas en el presente documento se expresa con frecuencia en términos de las posiciones de los aminoácidos de la forma del polipéptido del heterodímero de calcineurina humana de tipo silvestre expuesto en (GenBank: ACX34092.1).

En otra realización particular, dicha forma mutante puede comprender al menos un aminoácido mutado del heterodímero b de calcineurina de tipo silvestre en las posiciones: V120, N123, L124 o K125, preferentemente mutaciones dobles en las posiciones L124 y K125. En una realización particular, la valina en la posición 120 puede reemplazarse con un resto de serina, ácido aspártico, fenilalanina o leucina; la asparagina en la posición 123 puede reemplazarse con un resto de triptófano, lisina, fenilalanina, arginina, histidina o serina; la leucina en la posición 124 puede reemplazarse con un resto de treonina; la lisina en la posición 125 puede reemplazarse con un resto de alanina, ácido glutámico, triptófano, o pueden añadirse dos restos, tales como leucina-arginina o isoleucina-ácido glutámico después de la lisina en la posición 125 en la secuencia de aminoácidos que corresponde al GenBank: ACX34095.1. La correspondencia de las posiciones de aminoácidos descritas en el presente documento se expresa con frecuencia en términos de las posiciones de los aminoácidos de la forma del polipéptido del heterodímero b de calcineurina humana de tipo silvestre expuesto en (GenBank: ACX34095.1).

Otro gen de resistencia a fármacos es la 0(6)-metilguanina metiltransferasa (MGMT) que codifica la alquil guanina transferasa humana (hAGT). La AGT es una proteína reparadora de ADN que confiere resistencia a los efectos citotóxicos de agentes alquilantes, tales como nitrosoureas y temozolomida (TMZ). La 6-bencilguanina (6-BG) es un inhibidor de la AGT que potencia la toxicidad de la nitrosourea y se administra de forma conjunta con TMZ para potenciar los efectos citotóxicos de este agente. Varias formas mutantes de MGMT que codifican variantes de AGT son altamente resistentes a la inactivación por 6-BG, pero conservan su capacidad para reparar daños en el ADN (Maze, Kurpad et al. 1999). En una realización particular, la forma mutante de AGT puede comprender un aminoácido mutado de la posición P140 de AGT de tipo silvestre, en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 18 (UniProtKB: P16455). En una realización preferida, dicha prolina en la posición 140 se reemplaza con un resto de lisina.

Otro gen de resistencia a fármacos puede ser el gen de la proteína 1 de resistencia a múltiples fármacos (MDR1). Este gen codifica una glicoproteína de membrana, conocida como glucoproteína P (P-GP, *P-glycoprotein*) implicada en el transporte de subproductos metabólicos a través de la membrana celular. La proteína P-Gp muestra una amplia especificidad hacia varios agentes quimioterapéuticos no relacionados estructuralmente.

Se ha descrito que la sobreexpresión de la proteína 1 de resistencia a múltiples fármacos confiere resistencia a fármacos tales como la mitoxantrona (Charles S. Morrow, Christina Peklak-Scott, Bimjhana Bishwokarma, Timothy E. Kute, Pamela K. Smitherman y Alan J. Townsend. Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1, ABCC1) Mediates Resistance to Mitoxantrone via Glutathione-Dependent Drug Efflux *Mol Pharmacol* Abril de 2006 69:1499-1505).

Por tanto, la resistencia a fármacos puede conferirse a las células mediante la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica MDR-1 (NP_000918).

Otra forma más de preparar células resistentes a fármacos es preparar células una o más mutaciones específicas, tales como mutaciones en Arg486 y Glu571 en el gen de la Topoisomerasa II humana, para conferir resistencia a la amsacrina (S. PATEL, BA KELLER, y LM FISHER. 2000. MOLECULAR PHARMACOLOGY. Vol 57: p784-791 (2000).

Otra forma más de preparar células resistentes a fármacos es preparar células que sobreexpresen microARN-21 para conferir resistencia a la daunorrubicina (implicación de miR-21 en la resistencia a la daunorrubicina mediante la

regulación de la expresión de PTEN en la línea celular K562 de leucemia Bai, Haitao et al. FEBS Letters, Volumen 585, publicación 2, 402 - 408).

5 En una realización preferida, las células que llevan dicho ARNm o proteína que confiere resistencia a fármacos, también comprenden un ARNm inhibidor o un gen cuya expresión está condicionada, permitiendo la destrucción selectiva de dichas células resistentes al fármaco en presencia de dicho fármaco o después de la administración de dicho fármaco.

10 El gen de resistencia a fármacos también puede conferir resistencia a antibióticos citotóxicos, y puede ser el gen *ble* o el gen *mcrA*. La expresión ectópica del gen *ble* o *mcrA* en una célula inmunitaria ofrece una ventaja selectiva cuando se expone al agente quimioterapéutico, respectivamente, la bleomicina o la mitomicina C.

15 El enfoque más práctico de la terapia génica es la adición de un gen para diseñar linfocitos T utilizando un suministro de genes eficaz con vectores, preferentemente vectores víricos. Por tanto, en una realización particular, dicho gen de resistencia a fármacos puede expresarse en la célula introduciendo un transgén codificado preferentemente por al menos un vector en una célula.

20 En una realización, las células que llevan un gen de resistencia a un fármaco o un gen modificado que confiere resistencia a un fármaco también comprenden un gen suicida inducible, cuya inducción provoca la muerte celular, lo que permite su destrucción selectiva.

25 La inserción aleatoria de genes en el genoma puede conducir a la expresión inapropiada del gen insertado o del gen cerca del sitio de inserción. La terapia génica específica utilizando recombinación homóloga de ácido nucleico exógeno que comprende secuencias endógenas para dirigir genes diana a sitios específicos dentro del genoma, puede permitir la modificación por ingeniería genética segura de linfocitos T. Como se describe anteriormente, la etapa de modificación genética del método puede comprender una etapa de introducir en células un ácido nucleico exógeno que comprenda al menos una secuencia que codifique el gen de resistencia a un fármaco y una parte de un gen endógeno de tal manera que se produzca una recombinación homóloga entre el gen endógeno y el ácido nucleico exógeno. En una realización particular, dicho gen endógeno puede ser el gen de "resistencia a fármacos" de tipo silvestre, de tal manera que, después de la recombinación homóloga, el gen de tipo silvestre se reemplace por la forma mutante del gen que confiere resistencia al fármaco.

35 Se sabe que las roturas endonucleolíticas estimulan la tasa de recombinación homóloga. Por tanto, en una realización particular, el método de la invención comprende además la etapa de expresar en la célula una endonucleasa de corte raro que sea capaz de escindir una secuencia diana dentro de un gen endógeno. Dicho gen endógeno puede codificar, por ejemplo, DHFR, IMPDH2, calcineurina o AGT. Dicha endonucleasa de corte raro puede ser una nucleasa TALE, una nucleasa de dedo de zinc, una endonucleasa CRISPR/Cas9, una nucleasa o una meganucleasa MBBBD.

40 Inactivación de genes sensibilizadores de fármacos en células inmunitarias que expresan CAR anti-CD123

En otra realización particular, dicha resistencia a fármacos puede conferirse a la célula de la invención (célula inmunitaria que expresa un CAR anti-CD123), mediante la inactivación de un gen sensibilizador de fármacos.

45 El inventor buscó inactivar el posible gen sensibilizador de fármacos para diseñar linfocitos T para inmunoterapia, en particular para diseñar células inmunitarias que expresan CAR anti-CD123 que pueden utilizarse en combinación con un agente terapéutico (fármaco contra el cáncer).

50 Al inactivar un gen se pretende que el gen de interés no se exprese en una forma de proteína funcional. En una realización en particular, la modificación genética del método se basa en la expresión, en células proporcionadas, para diseñar, una endonucleasa de corte raro, de tal manera que dicha endonucleasa de corte raro cataliza específicamente la escisión en un gen diana inactivando de ese modo dicho gen diana. En una realización particular, la etapa de inactivar al menos un gen sensibilizador de fármacos comprende introducir en la célula una endonucleasa de corte raro capaz de alterar al menos un gen sensibilizador de fármacos. En una realización más particular, dichas células se transforman con ácido nucleico que codifica una endonucleasa de corte raro capaz de alterar un gen sensibilizador de fármacos, y dicha endonucleasa de corte raro se expresa en dichas células. Dicha endonucleasa de corte raro puede ser una meganucleasa, una nucleasa de dedo de zinc, una nucleasa CRISPR/Cas9, una nucleasa MBBBD o una nucleasa TALE. En una realización preferida, dicha endonucleasa de corte raro es una nucleasa TALE.

60 En una realización preferida, el gen sensibilizador de fármacos que puede inactivarse para conferir resistencia a fármacos a los linfocitos T es el gen de la desoxicitidina cinasa (dCK) humana. Esta enzima es necesaria para la fosforilación de los desoxirribonucleósidos desoxicitidina (dC), desoxiguanosina (dG) y desoxiadenosina (dA). Los análogos de nucleótidos de purina (PNA, del inglés *Purine Nucleotide Analogs*) se metabolizan mediante dCK en mono-, di- y tri-fosfato de PNA. Sus formas de trifosfato, y particularmente el trifosfato de clofarabina, compiten con el ATP para la síntesis de ADN, actúan como agentes proapoptóticos y son fuertes inhibidores de la ribonucleótido

reductasa (RNR) que participa en la producción de trinucleótidos.

Preferentemente, la inactivación de dCK en linfocitos T está mediada por la nucleasa TALE. Para conseguir este objetivo, se han diseñado varios pares de dCK nucleasa TALE, ensamblados a nivel de polinucleótidos y validados por secuenciación. En el documento PCT/EP2014/075317, se muestran ejemplos de pares de nucleasas TALE que pueden utilizarse según la invención.

Esta inactivación de dCK en linfocitos T confiere resistencia a los análogos de nucleósidos de purina (PNA), tales como clofarabina y fludarabina.

En otra realización preferida, la inactivación de dCK en linfocitos T se combina con una inactivación de genes TRAC, lo que hace que estos linfocitos T de doble desactivación (KO, *knock out*) sean resistentes a fármacos tales como la clofarabina y sean menos alógenicos. Esta doble característica es particularmente útil para un objetivo terapéutico, permitiendo que las células alógenicas "listas para usar" se administren en inmunoterapia junto con quimioterapia para tratar a los pacientes con cáncer. Esta doble inactivación KO dCK/TRAC puede realizarse de manera simultánea o secuencial. En el documento PCT/EP2014/075317 se describe un ejemplo de pares dCK/TRAC de nucleasa TALE que tuvieron éxito en la invención, en particular, las secuencias diana en los 2 locus (dCK y TRAC).

Otro ejemplo de enzima que puede inactivarse es el gen de la hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa (HPRT) humana (Genbank: M26434.1). En particular, la HPRT puede inactivarse en linfocitos T modificados por ingeniería genética para conferir resistencia a un metabolito citostático, la 6-tioguanina (6TG) que se convierte por HPRT en nucleótido de tioguanina citotóxica y que actualmente se utiliza para tratar pacientes con cáncer, en particular leucemias (Hacke, Treger et al. 2013). Los análogos de guaninas se metabolizan por la HPRT transferasa que cataliza la adición de la porción de fosforribosilo y permite la formación de TGMP. Los análogos de guanina, que incluyen 6 mercaptopurina (6MP) y 6 tioguanina (6TG), se utilizan normalmente como fármacos linforreductores para tratar la LLA. Se metabolizan por HPRT (hipoxantina fosforribosil transferasa que cataliza la adición de la porción de fosforribosilo y permite la formación de TGMP. Sus posteriores fosforilaciones conducen a la formación de sus formas trifosforiladas que finalmente se integran en el ADN. Una vez incorporado en el ADN, la tío GTP deteriora la fidelidad de la replicación del ADN a través de su agrupación de tios y genera mutaciones puntuales aleatorias que son altamente perjudiciales para la integridad celular.

En otra realización, la inactivación de CD3 normalmente expresado en la superficie del linfocito T puede conferir resistencia a anticuerpos anti-CD3 tales como teplizumab.

Las expresiones "agente terapéutico", "agente quimioterapéutico", "fármaco" o "fármaco anticanceroso", tal y como se utilizan en este documento, se refieren a un medicamento, preferentemente un compuesto o un derivado del mismo que pueda interactuar con una célula cancerosa, reduciendo así el estado proliferativo de la célula y/o destruyendo la célula. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos o "fármacos contra el cáncer" incluyen, pero sin limitación, agentes alquilantes (por ejemplo, Busulfán • Carboplatino • Clorambucilo • Cisplatino • Ciclofosfamida • Ifosfamida • Melfalán • Mecloretamina • Oxaliplatino • Uramustina • Temozolomida • Fotemustina), antagonistas metabólicos (por ejemplo, antimetabolito de nucleósido de purina, tal como clofarabina, fludarabina o 2'-desoxiadenosina, metotrexato (MTX), 5-fluorouracilo o derivados de los mismos, Azatioprina • Capecitabina • Citarabina • Floxuridina • Fluorouracilo • Gemcitabina • Metotrexato • Pemetrexed), antibióticos antitumorales (por ejemplo, mitomicina, Adriamicina, Bleomicina • Daunorrubicina • Doxorrubicina • Epirubicina • Hidroxiurea • Idarrubicina • Mitomicina C • Mitoxantrona), agentes antitumorales procedentes de plantas (por ejemplo, vincristina, vindesina, Taxol, Vinblastina • Vinorelbina) • Docetaxel • Paclitaxel), inhibidor de topoisomerasa (Irinotecán • Topotecán • Etopósido),

En una realización preferida, un agente terapéutico, un fármaco quimioterapéutico, como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto o a un derivado del mismo que puede utilizarse para tratar el cáncer, en particular para tratar una célula cancerosa hematopoyética y más particularmente LMA, reduciendo así el estado proliferativo de la célula cancerosa y/o destruyendo la célula cancerosa. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen, pero sin limitación, aracitina, arabinósido de citosina, amsacrina, daunorrubicina, idarrubicina, novantrona, mitoxantrona, vepesid, etopósido (VP16), *trioxido de arsénico*, *ácido transretinoico*, mecloretamina, procarbazona, clorambucilo, y combinaciones de los mismos.

En otras realizaciones de la presente invención, las células de la invención se administran a un paciente junto con un fármaco (o un agente) seleccionado de aracitina, arabinósido de citosina, amsacrina, daunorrubicina, idarrubicina, novantrona, mitoxantrona, vepesid, etopósido (VP16), *trioxido de arsénico*, *ácido transretinoico*, citarabina, antraciclinas, 6-tioguanina, hidroxiurea, prednisona, y combinaciones de las mismas.

Dichos agentes pueden incluir, además, pero sin limitación, los agentes contra el cáncer TRIMETHOTRIXATE™ (TMTX), TEMOZOLOMIDE™, RALTRITREXED™, S-(4-Nitrobencil)-6-tioinosina (NBMPR), 6-benziguanidina (6-BG), bis-cloronitrosourea (BCNU) y CAMPTOTHECIN™, o un derivado terapéutico de cualquiera de ellos.

En una realización más preferida, un linfocito T que expresa un CAR anti-CD123 de SEQ ID NO: 44 es para la

administración a un paciente, en combinación con al menos un agente terapéutico seleccionado de aracitina, arabinósido de citosina, amsacrina, daunorrubicina, idarrubicina, novantrona, mitoxantrona, vepesid, etopósido (VP16), *trioxido de arsénico*, *ácido transretinoico* y combinaciones de los mismos.

- 5 Como se usa en el presente documento, una célula que es "resistente o tolerante" a un agente, significa una célula que se ha modificado genéticamente de manera que la célula prolifera en presencia de una cantidad de un agente que inhibe o impide la proliferación de una célula sin la modificación.

Resistencia a múltiples fármacos de células inmunitarias que expresan CAR anti-CD123

- 10 En otra realización particular, los inventores buscaron desarrollar una estrategia de inmunoterapia "comercial", utilizando linfocitos T alogénicos, en particular, linfocitos T alogénicos que expresan CAR anti-CD123 resistentes a múltiples fármacos para mediar en la selección de linfocitos T modificados por ingeniería genética cuando el paciente se trata con diferentes fármacos. La eficacia terapéutica puede mejorarse significativamente modificando por ingeniería genética linfocitos T alogénicos resistentes a múltiples fármacos. Dicha estrategia puede ser particularmente eficaz en el tratamiento de tumores que responden a combinaciones de fármacos que muestran efectos sinérgicos. Por otra parte, los linfocitos T modificados por ingeniería genética resistentes a múltiples fármacos, pueden expandirse y seleccionarse utilizando una dosis mínima de agentes farmacológicos.

- 20 Por tanto, el método según la presente divulgación puede comprender la modificación del linfocito T para conferir a dicho linfocito T resistencia a múltiples fármacos. Dicha resistencia a múltiples fármacos puede conferirse ya sea expresando más de un gen de resistencia a un fármaco o inactivando más de un gen sensibilizador de un fármaco. En otra realización particular, la resistencia a múltiples fármacos puede conferirse a dichos linfocitos T expresando al menos un gen de resistencia a fármacos e inactivando al menos un gen sensibilizador de fármacos. En particular, la resistencia a múltiples fármacos puede conferirse a dichos linfocitos T expresando al menos un gen de resistencia a fármacos, tal como la forma mutante de DHFR, la forma mutante de IMPDH2, la forma mutante de calcineurina, la forma mutante de MGMT, el gen *ble* y el gen *mcrA* gen e inactivando al menos un gen sensibilizador de fármacos, tal como el gen HPRT. En una realización preferida, se puede conferir resistencia a múltiples fármacos inactivando el gen HPRT y expresando una forma mutante de DHFR; o inactivando el gen HPRT y expresando una forma mutante de IMPDH2; o inactivando el gen HPRT y expresando una forma mutante de calcineurina; inactivando el gen HPRT y expresando una forma mutante de MGMT; inactivando el gen HPRT y expresando el gen *ble*; inactivando el gen HPRT y expresando el gen *mcrA*.

- 35 En una realización, la presente invención proporciona linfocitos T alogénicos que expresan CAR anti-CD123 que expresan más de un gen de resistencia a fármacos o en el está inactivado más de un gen sensibilizador de fármacos.

- Genes suicidas en células inmunitarias que expresan CAR anti-CD123

- 40 En algunos casos, dado que los linfocitos T modificados por ingeniería genética pueden expandirse y persistir durante años después de la administración, puede ser deseable incluir un mecanismo de seguridad para permitir la eliminación selectiva de linfocitos T administrados. Por tanto, en algunas realizaciones, el método de la divulgación puede comprender la transformación de dichos linfocitos T con un gen suicida recombinante. Dicho gen suicida recombinante se utiliza para reducir el riesgo de toxicidad directa y/o la proliferación no controlada de dichos linfocitos T una vez administrados en un sujeto (Quintarelli C, Vera F, blood 2007; Tey SK, Dotti G., Rooney CM, boil blood marrow transplant 2007). Los genes suicidas permiten la eliminación selectiva de células transformadas *in vivo*. En particular, el gen suicida tiene la capacidad de convertir un profármaco no tóxico en un fármaco citotóxico o de expresar el producto de expresión génica tóxico. En otras palabras, el "gen suicida" es un ácido nucleico que codifica un producto, en el que el producto causa la muerte celular por sí mismo o en presencia de otros compuestos.

- 50 Un ejemplo representativo de dicho gen suicida es el que codifica la timidina cinasa del virus del herpes simple. Ejemplos adicionales son la timidina cinasa del virus de la varicela zóster y el gen bacteriano de citosina desaminasa que puede convertir la 5-fluorocitosina en el compuesto 5-fluorouracilo altamente tóxico. Los genes suicidas también incluyen, como ejemplos no limitantes, caspasa-9 o caspasa-8 o citosina desaminasa. La caspasa-9 puede activarse utilizando un inductor químico específico de dimerización (CID, por las siglas del inglés *chemical inducer of dimerization*). Los genes suicidas también pueden ser polipéptidos que se expresan en la superficie de la célula y pueden hacer que las células sean sensibles a anticuerpos monoclonales terapéuticos. Como se usa en este documento, "profármaco" significa cualquier compuesto útil en los métodos de la presente invención que se puede convertir en un producto tóxico. El profármaco se convierte en un producto tóxico por el producto génico del gen suicida en el método de la presente invención. Un ejemplo representativo de dicho profármaco es el ganciclovir que se convierte *in vivo* en un compuesto tóxico mediante la timidina cinasa del VHS. El derivado de ganciclovir posteriormente es tóxico para las células tumorales. Otros ejemplos representativos de profármacos incluyen aciclovir, FIAU [1-(2-desoxi-2-fluoro-β-D-arabinofuranosil)-5-yodouracilo], arabinósido de 6-metoxipurina para VZV-TK, y 5-fluorocitosina para citosina desaminasa.

Un sistema génico suicida preferido emplea un polipéptido antigénico recombinante que comprende un motivo antigénico reconocido por Rituximab, un mAb (anticuerpo monoclonal) anti-CD20, especialmente QBen10, tal como en el polipéptido denominado RQR8 descrito en el documento WO2013153391. Rituximab, un fármaco autorizado de anticuerpos, puede utilizarse por tanto para la depleción celular cuando sea necesario.

5 En una realización, la presente invención proporciona linfocitos T alogénicos que expresan CAR anti-CD123 que expresan más de un gen de resistencia a fármacos o en los que se inactiva más de un gen sensibilizador de fármacos, y un gen suicida que permite que se destruyan dichas células.

10 Células inmunitarias que expresan CAR anti-CD123 resistentes a clofarabina

La divulgación incluye la fabricación de linfocitos T para uso terapéutico, que son resistentes a fármacos tal como a Clofarabina. Se pueden obtener por inactivación del gen dCK como se explicó anteriormente. Según una realización preferida, los linfocitos T se hacen resistentes a la quimioterapia y menos alogénicos al combinar la inactivación de los genes dCK y TCR como se describió anteriormente.

15 Por tanto, la presente invención proporciona una célula que expresa un CAR anti-CD123, en particular, un linfocito T que expresa un CAR anti-CD123 donde el CAR deriva de Klon 43 (que comprende una SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 44, opcionalmente humanizada) y donde el gen dCK está inactivado.

20 Células Daudi resistentes fármacos CD123+/luc+ para ensayar la citotoxicidad de linfocitos T CAR alogénicos resistentes a fármacos

La presente divulgación también incluye un método para fabricar células diana que expresan tanto un receptor de superficie específico para linfocitos T CAR como un gen de resistencia. Estas células diana son particularmente útiles para ensayar la citotoxicidad de los linfocitos T CAR. Estas células son fácilmente resistentes a la dosis clínicamente relevante de clofarabina y albergan actividad luciferasa. Esta combinación de características permite rastrearlas *in vivo* en un modelo de ratones o destruirlas cuando sea necesario.

25 Más particularmente, pueden utilizarse para evaluar las propiedades de citotoxicidad de los linfocitos T resistentes a fármacos en ratones en presencia de clofarabina u otros PNA. Las células Daudi resistentes a clofarabina, imitan el estado fisiológico de los pacientes con leucemia linfoblástica aguda (LLA) en recaída de la terapia de inducción, que albergan neoplasias malignas de linfocitos B resistentes a fármacos. Por tanto, estas células son de gran interés para evaluar la confiabilidad y la citotoxicidad de los linfocitos T CAR resistentes a fármacos. Preferentemente, estas células diana son células CD123+ Luciferasa + Daudi.

30 Célula aislada

La presente invención se refiere a una célula aislada que expresa un CAR que se une a CD123. Por tanto, la invención se refiere a una célula que expresa un CAR anti-CD123. En una realización particular, dicha célula que expresa un CAR anti-CD123 es resistente a al menos un fármaco y/o comprende al menos un gen alterado que codifica un componente del receptor de linfocitos T.

45 En una realización preferida, la presente invención se refiere a un linfocito T aislado que expresa un CAR que se une a CD123. La invención se refiere a un linfocito T que expresa un CAR anti-CD123. En una realización particular, dicho linfocito T que expresa un CAR anti-CD123 es resistente a al menos un fármaco y/o comprende al menos un gen alterado que codifica un componente del receptor de linfocitos T.

50 En una realización particular, dicho linfocito T CAR anti-CD123 expresa al menos un gen de resistencia a fármacos, preferentemente el gen *ble* o el gen *mcrA* o un gen que codifica un DHFR mutante, un IMPDH2 mutante, un AGT mutante o una calcineurina mutante.

En otra realización particular, dicho linfocito T que expresa CAR anti-CD123 comprende al menos un gen sensibilizador de fármaco alterado tal como el gen dCK o HPRT. En una realización más particular, dicho linfocito T CAR anti-CD123 aislado comprende un gen HPRT alterado y expresa un mutante de DHFR; dicho linfocito T CAR anti-CD123 aislado comprende un gen HPRT alterado y expresa un mutante de IMPDH2; dicho linfocito T CAR anti-CD123 aislado comprende un gen HPRT alterado y expresa un mutante de calcineurina; dicho linfocito T CAR anti-CD123 aislado comprende un gen HPRT alterado y expresa un mutante de AGT.

60 Linfocitos T CAR anti-CD123 alogénicos resistentes a un fármaco para su uso en inmunoterapia

En particular, la presente invención se refiere a un linfocito T alogénico, en particular un linfocito T alogénico que expresa un CAR anti-CD123 y preferentemente un linfocito T alogénico que expresa un CAR anti-CD123 que comprende un péptido que tiene una identidad del 80 % al 100 % con scfv de Klon 43, dicho linfocito T alogénico que expresa un CAR anti-CD123 que comprende un péptido que tiene una identidad del 80 % al 100 % con scfv de Klon 43 es más particularmente resistente a un fármaco, y es específicamente adecuado para la inmunoterapia.

En una realización preferida, dicho linfocito T alogénico que expresa un CAR anti-CD123 comprende un péptido que tiene una identidad del 80 % al 100 % con la SEQ ID NO:44 y es más particularmente resistente a un fármaco, y específicamente adecuado para inmunoterapia.

5 La resistencia de un fármaco puede conferirse a través de la inactivación de genes sensibilizadores de fármacos o a través de la expresión de genes de resistencia a fármacos. Algunos ejemplos de fármacos que se adaptan a la invención son los análogos nucleosídicos de purina (PNA, siglas del inglés *purine nucleoside analogues*), tales como clofarabina o fludarabina, u otros fármacos tales como 6-mercaptopurina (6MP) y 6 tioguanina (6TG).

10 En un aspecto, la presente divulgación proporciona métodos para modificar por ingeniería genética células inmunitarias para hacerlas resistentes a análogos nucleosídicos de purina (PNA), tales como clofarabina o fludarabina, de modo que puedan utilizarse en tratamientos de inmunoterapia del cáncer en pacientes previamente tratados con estas quimioterapias convencionales.

15 La resistencia a los fármacos puede conferirse a los linfocitos T inactivando uno o más genes responsables de la sensibilidad de las células al fármaco (gen o genes sensibilizadores de fármacos), tales como los genes *dcK* y/o *HPRT*.

20 Según otro aspecto, la resistencia a los fármacos puede conferirse a un linfocito T expresando un gen de resistencia a fármacos. Se han identificado alelos variantes de varios genes, tales como dihidrofolato reductasa (DHFR), inosina monofosfato deshidrogenasa 2 (IMPDH2), calcineurina o metilguanina transferasa (MGMT) que confieren resistencia a fármacos a una célula según la invención.

25 Por ejemplo, CD52 y receptores de glucocorticoides (RG), que son dianas farmacológicas de tratamientos con Campath (alemtuzumab) o rituximab y con glucocorticoides, se pueden inactivar para hacer que las células sean resistentes a estos tratamientos y otorgarlas una ventaja competitiva sobre los propios linfocitos T del paciente no dotados de los CAR específicos de CD123. La expresión del gen CD3 también puede suprimirse o reducirse para conferir resistencia a Teplizumab, que es otro fármaco inmunosupresor. La expresión de *HPRT* también puede suprimirse o reducirse según la invención para conferir resistencia a la 6-tioguanina, un agente citostático comúnmente utilizado en quimioterapia, especialmente para el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda.

30 Según un aspecto adicional de la invención, las células inmunitarias también pueden manipularse para hacerlas más activas o limitar su agotamiento, inactivando genes que codifican proteínas que actúan como "puntos de control inmunitarios" que actúan como reguladores de la activación de linfocitos T, tales como los siguientes genes seleccionados de *CTLA4*, *PPP2CA*, *PPP2CB*, *PTPN6*, *PTPN22*, *PDCD1*, *LAG3*, *HAVCR2*, *BTLA*, *CD160*, *TIGIT*, *CD96*, *CRTAM*, *LAIR1*, *SIGLEC7*, *SIGLEC9*, *CD244*, *TNFRSF10B*, *TNFRSF10A*, *CASP8*, *CASP10*, *CASP3*, *CASP6*, *CASP7*, *FADD*, *FAS*, *TGFBRII*, *TGFBRI*, *SMAD2*, *SMAD3*, *SMAD4*, *SMAD10*, *SKI*, *SKIL*, *TGIF1*, *IL10RA*, *IL10RB*, *HMOX2*, *IL6R*, *IL6ST*, *CSK*, *PAG1*, *SIT1*, *FOXP3*, *PRDM1* (*orblimp1*), *BATF*, *GUCY1A2*, *GUCY1A3*, *GUCY1B2*, *GUCY1B3*, preferentemente, dicho gen es *PDCD1* o *CTLA-4*. En la Tabla 9 se indican ejemplos de genes cuya expresión podría reducirse o suprimirse.

40 En una realización, dicho gen es un gen que actúa como un regulador de la activación de linfocitos T que codifica la proteína beta 2 microglobulina.

45 Según un aspecto adicional de la invención, las células inmunitarias CAR anti-CD123 de la invención también pueden manipularse para hacerlas resistentes a un fármaco, en particular a un fármaco utilizado durante la quimioterapia contra el cáncer, en particular, un cáncer, tal como LMA, mediado por células que expresan CD123. Esto puede realizarse introduciendo un gen que confiere resistencia a dicho fármaco. Este mismo gen puede activarse y desactivarse utilizando un sistema de inhibición/expresión inducible por genes como se describió anteriormente (Garcia EL, Mills AA (2002) Getting around lethality with inducible Cre-mediated excision. *Semin Cell Dev Biol* 13:151-8, Lewandoski M (2001) Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat Rev Genet* 2:743-55g; Scharfenberger L, Hennerici T, Kirly G *et al.* (2014) Transgenic mouse technology in skin biology: Generation of complete or tissue-specific knockout mice. *J Invest Dermatol* 134:e16; Schwenk F, Kuhn R, Angrand PO *et al.* (1998) Temporally and spatially regulated somatic mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res* 26:1427-32.

50 Por tanto, células inmunitarias resistentes a fármacos que expresan un CAR anti-CD123, en donde (i) se inactiva al menos un gen que expresa uno o más componentes del receptor de linfocitos T (TCR) (ii) se incorpora al menos un gen que confiere resistencia a un fármaco o un gen que confiere sensibilidad a dicho fármaco se elimina o muta a estar inactivado (iii) opcionalmente, otro gen seleccionado del gen descrito en la tabla 9 está inactivado, es un objeto de la presente invención.

60 La presente invención incluye las células inmunitarias o líneas celulares CAR anti-CD123 aisladas que pueden obtenerse mediante el método de la invención, más particularmente células aisladas que comprenden cualquiera de las proteínas, polipéptidos, variantes alélicas, genes o vectores alterados o eliminados descritos en el presente documento.

Las células inmunitarias o las líneas celulares de la presente invención pueden comprender además polinucleótidos recombinantes exógenos, en particular CAR o genes suicidas o pueden comprender genes alterados o eliminados que codifican proteínas de punto de control o sus ligandos que contribuyen a su eficacia como un producto terapéutico, idealmente como un producto "comercial". En otro aspecto, la presente invención se refiere al método para tratar o prevenir cáncer en el paciente, administrando al menos una vez una célula inmunitaria modificada por ingeniería genética obtenible a través de los métodos anteriores.

Tabla 9: Lista de genes que codifican proteínas de punto de control inmunitarias.

	Ruta	Genes que pueden inactivarse en la ruta	
Correceptores inhibitorios	CTLA4 (CD152)	CTLA4, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22	
	PDCD1 (PD-1, CD279)	PDCD1	
	CD223 (lag3)	LAG3	
	HAVCR2 (tim3)	HAVCR2	
	BTLA(cd272)	BTLA	
	CD160(by55)	CD160	
	Familia IgSF		TIGIT
			CD96
			CRTAM
	LAIRI (cd305)	LAIR1	
	SIGLECs		SIGLEC7
		SIGLEC9	
CD244(2b4)	CD244		
Receptores de muerte	TRAIL	TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7	
	FAS	FADD, FAS	
Señalización de citocinas	Señalización de TGF-beta	TGFBRII, TGFBRI, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1	
	Señalización de IL10	IL10RA, IL10RB, HMOX2	
	Señalización de IL6	IL6R, IL6ST	
Prevención de la señalización de TCR CSK, PAG1		CSK, PAG1	
		SIT1	
Treg inducidos	Treg inducidos	FOXP3	
Factores de transcripción que controlan el agotamiento	Factores de transcripción que controlan el agotamiento	PRDM1 (= blimpl, ratones heterocigotos controlan infección vírica crónica mejor que KO wt (tipo silvestre) o condicionales)	
		BATF	
Tolerancia mediada por hipoxia	Ciclasa guanilada inducida por iNOS	GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2, GUCY1B3	

Tabla 10: Secuencia de los diferentes fragmentos de anticuerpos humanizados

Dominios funcionales	SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos natural
scFv humanizado de Klon43 Variante VL1	SEQ ID NO: 54	MADYKDIVMTQSPSSVSASVGDRVITICRA SQNVDSAVAWYQQKPGKAPKALIYSASYRY SGVPSRFSGRGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQYYSTPWTFGQGTKVEIKR
scFv humanizado de Klon43 Variante VL2	SEQ ID NO: 55	MADYKDIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRA SQNVDSAVAWYQQKPGKAPKALIYSASYRY SGVPSRFSGRGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQYYSTPWTFGQGTKVEIKR

ES 2 740 903 T3

scFv humanizado de Klon43 Variante VL3	SEQ ID NO: 56	MADYKDIQMTQSPSSVSASVGDRVTTCRA SQNVDSAVAWYQQKPGKAPKALIYSASYRY SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQYYSTPWTFGQGTKVEIKR
--	---------------	---

ES 2 740 903 T3

(continuación)

Dominios funcionales	SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos natural
scFv humanizado de Klon43 Variante VL4	SEQ ID NO: 57	MADYKDIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRA SQNVDSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRY SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYYSTPWTFGQGTKVEIKR
scFv humanizado de Klon43 Variante VL5	SEQ ID NO: 58	MADYKDIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRA SQNVDSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYYSTPWTFGQGTKVEIKR
scFv humanizado de Klon43 Variante VL6	SEQ ID NO: 59	MADYKDIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRA SQNVDSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYGQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYYSTPWTFGQGTKVEIKR
scFv humanizado de Klon43 Variante VH1	SEQ ID NO: 60	EVKLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTDY YMSWVRQAPGKGLEWVGLIRSKADGYTTEY VKGRFTISRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAVYYC ARDAAYYSYSPGAMDYWGQGTLVTVSS
scFv humanizado de Klon43 Variante VH2	SEQ ID NO: 61	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTD' YMSWVRQAPGKGLEWVGLIRSKADGYTTEY SVKGRFTISRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAVY YCARDAAAYYSYSPGAMDYWGQGTLVTVS
scFv humanizado de Klon43 Variante VH3	SEQ ID NO: 62	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTD' YMSWVRQAPGKGLEWVGLIRSKADGYTTEY VKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYY RDAAYYSYSPGAMDYWGQGTLVTVSS
scFv humanizado de Klon43 Variante VH4	SEQ ID NO: 63	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTD' YMSWVRQAPGKGLEWVGFIRSKADGYTTEY VKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYY RDAAYYSYSPGAMDYWGQGTLVTVSS

(continuación)

Dominios funcionales	SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos natural
scFv humanizado de Klon43 Variante VH5	SEQ ID NO: 64	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTD' YMSWVRQAPGKGLEWVGFIRSKADGYTTEY VKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYY RDAAYSYSPPEGAMDYWGQGTLVTVSS
scFv humanizado de Klon43 Variante VH6	SEQ ID NO: 65	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTD' YMSWVRQAPGKGLEWVGLIRSKADGYTTEY SVKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVY CARDAAYSYSPPEGAMDYWGQGTLVTVSS
scFv humanizado de Klon43 Variante VH7	SEQ ID NO: 66	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTD YYMSWVRQAPGKGLEWVGFIRSKADGYTT EYAASVKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTE DTAVYYCTRDAAYSYSPPEGAMDYWGQG TLVTVSS

En una realización preferida, dicho método de diseño adicional de células inmunitarias implica la introducción de linfocitos T en dichos polinucleótidos, en particular ARNm, que codifican una endonucleasa específica de corte raro para inactivar selectivamente los genes mencionados anteriormente mediante escisión de ADN. En una realización más preferida, dichas endonucleasas de corte raro son nucleasas TALE o endonucleasas Cas9. Las nucleasas TAL han demostrado hasta ahora mayor especificidad y eficacia de escisión sobre los otros tipos de endonucleasas de corte raro, convirtiéndolas en las endonucleasas de elección para la producción a gran escala de células inmunitarias modificadas por ingeniería genética con una renovación constante.

10 Métodos de suministro

Los diferentes métodos descritos anteriormente implican la expresión de una proteína de interés tal como un gen de resistencia a fármacos, endonucleasas de corte raro, receptores antigénicos quiméricos (CAR), en particular, un CAR anti-CD123 y, más particularmente, un CAR que comprende una SEQ ID NO: 1+ SEQ ID NO: 44, y un gen suicida en una célula.

Como ejemplo no limitante, dicha proteína de interés puede expresarse en la célula mediante su introducción como un transgén preferentemente codificado por al menos un vector plasmídico. Los polipéptidos pueden expresarse en la célula como resultado de la introducción de polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos en la célula. Como alternativa, dichos polipéptidos podrían producirse fuera de la célula y después introducirse en ella.

En la técnica se conocen métodos para introducir una construcción polinucleotídica en las células e incluyen, como ejemplos no limitativos, métodos de transformación estable en los que la construcción polinucleotídica está integrada en el genoma de la célula, métodos de transformación transitoria en los que la construcción polinucleotídica no está integrada en el genoma de la célula y métodos mediados por virus.

Dichos polinucleótidos pueden introducirse en una célula, por ejemplo, a través de vectores víricos recombinantes (por ejemplo, retrovirus, adenovirus), liposomas y similares. Por ejemplo, los métodos de transformación transitoria incluyen, por ejemplo, microinyección, electroporación o bombardeo de partículas, fusión celular. Dichos polinucleótidos pueden incluirse en vectores, más particularmente en plásmidos o virus, dado que se expresan en células. Dicho vector plasmídico puede comprender un marcador de selección que proporciona la identificación y/o selección de células que recibieron dicho vector.

En un vector pueden incluirse diferentes transgenes. Dicho vector puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de salto ribosómico, tal como una secuencia que codifica un péptido 2A. Los péptidos 2A, que se identificaron en el subgrupo de Aftovirus de los picornavirus, ocasionan un "salto" ribosomal de un codón al siguiente sin la formación de un enlace peptídico entre los dos aminoácidos codificados por los codones

(véase Donnelly et al., J. of General Virology 82: 1013-1025 (2001); Donnelly et al., J. de Gen. Virology 78: 13-21 (1997); Doronina et al., Mol. And. Cell. Biology 28(13): 4227-4239 (2008); Atkins et al., RNA 13: 803-810 (2007)).

5 Por "codón" se entiende tres nucleótidos en un ARNm (o en la cadena en sentido de una molécula de ADN) que un ribosoma traduce en un resto de aminoácido. Por tanto, a partir de un solo marco de lectura abierto contiguo dentro de un ARNm, pueden sintetizarse dos polipéptidos cuando los polipéptidos están separados por una secuencia oligopeptídica 2A que está en marco. Dichos mecanismos de salto ribosómico son muy conocidos en la técnica y se sabe varios vectores los utilizan para la expresión de varias proteínas codificadas por un solo ARN mensajero.

10 En una realización más preferida de la invención, los polinucleótidos que codifican polipéptidos según la presente invención pueden ser ARNm que se introducen directamente en las células, por ejemplo, por electroporación. Los inventores determinaron las condiciones óptimas de la electroporación de ARNm en linfocitos T. El inventor utilizó la tecnología cytoPulse que permite, utilizando campos eléctricos pulsados, permeabilizar transitoriamente células vivas para el suministro de material al interior de las células. La tecnología, basada en el uso de formas de onda de electroporación PulseAgile (BTX Havard Apparatus, 84 October Hill Road, Holliston, MA 01746, Estados Unidos), garantiza el control exacto de la duración del pulso, de la intensidad así como del intervalo entre los pulsos (patente de Estados Unidos 6 010 613 y solicitud internacional PCT W02004083379). Todos estos parámetros pueden modificarse para obtener las mejores condiciones para una alta eficacia de transfección con una mortalidad mínima. Básicamente, los primeros pulsos de campo eléctrico alto permiten la formación de poros, mientras que los pulsos posteriores de campo eléctrico bajo permiten llevar el polinucleótido al interior de la célula.

Los diferentes métodos descritos anteriormente implican la introducción del CAR en una célula. Como ejemplo no limitante, dicho CAR puede introducirse como transgenes codificados por un vector plasmídico. Dicho vector plasmídico también puede contener un marcador de selección que proporciona la identificación y/o selección de células que recibieron dicho vector.

30 Como resultado de la introducción de los polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos en la célula, los polipéptidos pueden sintetizarse *in situ* en la célula. Como alternativa, dichos polipéptidos podrían producirse fuera de la célula y después introducirse en ella. En la técnica se conocen métodos para introducir una construcción polinucleotídica en las células e incluyen, como ejemplos no limitativos, métodos de transformación estable en los que la construcción polinucleotídica está integrada en el genoma de la célula, métodos de transformación transitoria en los que la construcción polinucleotídica no está integrada en el genoma de la célula y métodos mediados por virus. Dichos polinucleótidos pueden introducirse en una célula, por ejemplo, a través de vectores víricos recombinantes (por ejemplo, retrovirus, adenovirus), liposomas y similares. Por ejemplo, los métodos de transformación transitoria incluyen, por ejemplo, microinyección, electroporación o bombardeo de partículas. Dichos polinucleótidos pueden incluirse en vectores, más particularmente en plásmidos o virus, dado que se expresan en células.

40 Células inmunitarias modificadas por ingeniería genética

La presente invención también se refiere a células aisladas o a líneas celulares susceptibles de obtenerse por dicho método para modificar por ingeniería genética las células. En particular, dicha célula aislada comprende al menos un CAR como se describe anteriormente. En otra realización, dicha célula aislada comprende una población de CAR comprendiendo cada uno de ellos diferentes dominios de unión a ligando extracelular. En particular, dicha célula aislada comprende una secuencia de polinucleótidos exógena que codifica un CAR. Las células inmunitarias modificadas genéticamente de la presente invención se activan y proliferan independientemente de los mecanismos de unión al antígeno.

50 En el alcance de la presente invención también se incluye una célula inmunitaria aislada, preferentemente un linfocito T obtenido según uno cualquiera de los métodos descritos anteriormente. Dicha célula inmunitaria se refiere a una célula de origen hematopoyético implicada funcionalmente en el inicio y/o ejecución de una respuesta inmunitaria innata y/o adaptativa. Dicha célula inmunitaria según la presente invención puede proceder de una célula madre. Las células madre pueden ser células madre adultas, células madre embrionarias no humanas, más particularmente, células madre no humanas, células madre de sangre del cordón umbilical, células progenitoras, células madre de médula ósea, células madre pluripotentes inducidas, células madre totipotentes no humanas o células madre hematopoyéticas. Las células humanas representativas son células CD34+. Dicha célula aislada también puede ser una célula dendrítica, una célula dendrítica destructora, un mastocito, un linfocito citolítico natural (NK, *natural killer*), un linfocito B o un linfocito T seleccionada del grupo que consiste en linfocitos T inflamatorios, linfocitos T citotóxicos, linfocitos T reguladores o linfocitos T auxiliares. En otra realización, dicha célula puede proceder del grupo que consiste en linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+. Antes de la expansión y modificación genética de las células de la invención, a través de una variedad de métodos no limitativos puede obtenerse una fuente de células de un sujeto. Las células pueden obtenerse de diversas fuentes no limitantes, incluyendo células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de ganglios linfáticos, sangre de cordón umbilical, tejido del timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, derrame pleural, tejido del bazo, y tumores. En determinadas realizaciones de la presente invención, puede utilizarse cualquier número de líneas de linfocitos T disponibles y conocidas por los expertos en la materia. En otra realización, dicha célula puede proceder de un donante sano, de

un paciente diagnosticado con cáncer o de un paciente diagnosticado con una infección. En otra realización, dicha célula forma parte de una población mixta de células que presentan características fenotípicas diferentes. En el alcance de la presente invención también se incluye una línea celular obtenida a partir de un linfocito T transformado según el método descrito anteriormente. En el alcance de la presente invención se incluyen células modificadas resistentes a un tratamiento inmunosupresor y susceptibles de obtenerse por el método anterior.

Como una realización preferida, la presente invención proporciona linfocitos T o una población de linfocitos T dotados de un CAR específico de CD123, como se describe anteriormente, que no expresan un TCR funcional y que son reactivos hacia células positivas para CD123, para su trasplante alogénico en pacientes.

Como una realización más preferida, la presente invención proporciona linfocitos T o una población de linfocitos T dotados de un CAR específico de CD123 y que son reactivos hacia células positivas para CD123 como se ha descrito anteriormente, que no expresan un TCR funcional y que son resistentes a un fármaco seleccionado, para su trasplante alogénico en pacientes tratados con dicho fármaco seleccionado.

En una realización aún más preferida, la presente invención proporciona linfocitos T o una población de linfocitos T dotados de un CAR anti-CD123 que comprende un polipéptido de SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 44, incluso más preferentemente un CAR anti-CD123 que comprende 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 44, en particular, un CAR anti CD123 que comprende del 85 % al 99 % de identidad con SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 44.

Activación y expansión de linfocitos T

Ya sea antes o después de la modificación genética de los linfocitos T, incluso si las células inmunitarias modificadas genéticamente de la presente invención se activan y proliferan independientemente de los mecanismos de unión al antígeno, las células inmunitarias, en particular, los linfocitos T de la presente invención, pueden activarse y expandirse adicionalmente en general utilizando los métodos descritos, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos 6 352 694; 6 534 055; 6 905 680; 6 692 964; 5 858 358; 6 887 466; 6 905 681; 7 144 575; 7 067 318; 7 172 869; 7 232 566; 7 175 843; 5 883 223; 6 905 874; 6 797 514; 6 867 041; y en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N° 20060121005. Los linfocitos T pueden expandirse *in vitro* o *in vivo*.

Generalmente, los linfocitos T de la invención se expanden por contacto con un agente que estimula un complejo CD3 TCR y una molécula coestimuladora en la superficie de los linfocitos T para crear una señal de activación para los linfocitos T. Por ejemplo, productos químicos, tales como ionóforo de calcio A23187, forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) o lectinas mitogénicas como fitohemaglutinina (PHA), pueden utilizarse para crear una señal de activación para los linfocitos T.

Como ejemplos no limitantes, las poblaciones de linfocitos T pueden estimularse *in vitro* tal como por contacto con un anticuerpo anti-CD3, o su fragmento de unión a antígeno, o con un anticuerpo anti-CD2 inmovilizado en una superficie, o por contacto con un activador de proteína cinasa C (por ejemplo, briostatina) junto con un ionóforo de calcio. Para la coestimulación de una molécula accesoria en la superficie de los linfocitos T, se utiliza un ligando que une la molécula accesoria. Por ejemplo, una población de linfocitos T puede ponerse en contacto con un anticuerpo anti-CD3 y con un anticuerpo anti-CD28, en condiciones apropiadas para estimular la proliferación de los linfocitos T. Las condiciones apropiadas para el cultivo de linfocitos T incluyen un medio apropiado (por ejemplo, Medio Esencial Mínimo o medio RPMI 1640 o, X-vivo 5, (Lonza)) que puede contener factores necesarios para la proliferación y viabilidad, incluyendo suero (por ejemplo, suero fetal bovino o humano), interleucina-2 (IL-2), insulina, IFN-g, 1L-4, 1L-7, GM-CSF, -10, -2, 1L-15, TGFp y TNF o cualquier otro aditivo para el crecimiento de células conocido por el experto en la técnica. Otros aditivos para el crecimiento de células incluyen, pero sin limitación, un tensioactivo, plasmanato, y agentes reductores tales como N-acetil-cisteína y 2-mercaptoetanol. Los medios pueden incluir RPMI 1640, A1M-V, DMEM, MEM, a-MEM, F-12, X-Vivo 1 y X-Vivo 20, un mejorador, con aminoácidos añadidos, piruvato de sodio y vitaminas, ya sea sin suero o complementado con una cantidad apropiada de suero (o plasma) o un conjunto definido de hormonas, y/o una cantidad suficiente de citocinas para el crecimiento y la expansión de linfocitos T. Antibióticos, por ejemplo, penicilina y estreptomina, se incluyen solo en cultivos experimentales, no en cultivos de células que se van a infundir a un sujeto. Las células diana se mantienen en condiciones necesarias para soportar el crecimiento, por ejemplo, una temperatura (por ejemplo, 37 °C) y atmósfera (por ejemplo, aire y CO₂ al 5 %) apropiadas. Los linfocitos T que se han expuesto a diferentes tiempos de estimulación pueden presentar características diferentes.

En otra realización particular, dichas células pueden expandirse co-cultivando con tejidos o células. Dichas células también pueden ser para su uso en expansión *in vivo*, por ejemplo, en la sangre del sujeto después de administrar dicha célula en el sujeto.

Aplicaciones terapéuticas

En otra realización, la célula aislada obtenida por los diferentes métodos o la línea celular procedente de dicha célula

aislada como se describió anteriormente, puede utilizarse como un medicamento.

En otra realización, dicho medicamento puede utilizarse en el tratamiento de cáncer, particularmente para el tratamiento de linfomas de linfocitos B y leucemia en un paciente que lo necesite.

5 En otra realización, dicha célula aislada según la invención o línea celular procedente de dicha célula aislada puede utilizarse en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer en un paciente que lo necesite.

10 En una realización particular, se proporciona un linfocito T que expresa un CAR anti-CD123 como un medicamento para el tratamiento de LMA, de un subtipo de LMA, de una complicación relacionada con LMA, de una afección relacionada con LMA. En una realización preferida, como un medicamento, se proporciona un linfocito T que expresa un CAR anti-CD123 en el que dicho CAR anti-CD123 comprende la SEQ ID NO 44.

15 En otra realización, dicho medicamento puede utilizarse en el tratamiento de una afección patológica mediada por células que expresan CD123 o una afección caracterizada por la actividad directa o indirecta de una célula que expresa CD123. En otras palabras, la invención se refiere a un linfocito T que expresa un CAR anti-CD123 que comprende del 80 % al 100 % de la SEQ ID NO: 44 para su uso como medicamento para tratar una afección relacionada con la actividad perjudicial de células que expresan CD123, en particular para tratar una afección seleccionada de LMA, un subtipo de LMA, complicaciones relacionadas con LMA y afecciones relacionadas con LMA;

20 En otro aspecto, la presente invención se basa en métodos de tratamiento de pacientes que lo necesiten, comprendiendo dicho método al menos una de las siguientes etapas:

- 25 (a) proporcionar una célula inmunitaria obtenible por uno cualquiera de los métodos descritos anteriormente;
(b) administrar a dicho paciente dichas células inmunitarias transformadas,

En una realización, dichos linfocitos T de la invención pueden experimentar una fuerte expansión de linfocitos T *in vivo* y puede persistir durante un período de tiempo prolongado.

30 Dicho tratamiento puede ser mejorativo, curativo o profiláctico. Puede formar parte de un tratamiento de inmunoterapia autóloga o parte de un tratamiento de inmunoterapia alogénica. Por autóloga, se entiende que las células, la línea celular o la población de células utilizadas para tratar pacientes, se originan en dicho paciente o en un donante compatible con los antígenos leucocitarios humanos (HLA, *Human Leucocyte Antigen*). Por alogénica se entiende que las células o la población de células utilizadas para tratar pacientes, no se originan en dicho paciente sino en un donante.

40 En el apartado anterior se describen células que pueden utilizarse con los métodos desvelados. Dicho tratamiento puede utilizarse para tratar pacientes diagnosticados en los que una afección de cáncer pre-maligno o maligno se caracteriza por células que expresan CD123, especialmente por una sobreabundancia de células que expresan CD123. Dichas condiciones se encuentran en cánceres hematológicos, tales como leucemia o trastornos linfoproliferativos malignos. El trastorno linfoproliferativo puede ser linfoma, en particular mieloma múltiple, linfoma no Hodgkin, linfoma de Burkitt y linfoma folicular (células pequeñas y células grandes).

45 Los cánceres que pueden tratarse pueden comprender tumores no sólidos (tales como tumores hematológicos, incluyendo, pero sin limitación, LLA pre-B (indicación pediátrica), LLA en adultos, linfoma de células del manto, linfoma difuso de linfocitos B grandes y similares. Los tipos de cánceres a tratar con los CAR de la invención incluyen, pero sin limitación, leucemia o neoplasias linfoides. También se incluyen tumores/cánceres en adultos y tumores/cánceres en niños.

50 La presente divulgación proporciona una composición para su uso en el tratamiento de una enfermedad mediada por células que expresan CD123, en particular un cáncer hematológico mediado por células que expresan CD123, comprendiendo dicha composición dicho linfocito T anti-CD123 que expresa el linfocito T de la invención, preferentemente dicho CAR anti-CD123 es de SEQ ID NO: 44 o de SEQ ID NO: 1+ SEQ ID NO: 44.

55 Cualquier otro trastorno linfoproliferativo maligno mediado por CD123 o que implique CD123 desvelado en el presente documento, puede mejorarse con las células que expresan CAR anti-CD123 de la presente invención.

60 En una realización preferida, el cáncer que puede tratarse utilizando las células que expresan CAR anti-CD123 de la presente invención es leucemia, una enfermedad asociada a leucemia o una complicación de la misma.

Las leucemias que pueden tratarse con las células que expresan CAR anti-CD123 de la presente invención, pueden ser leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia mielógena crónica, síndrome mielodisplásico, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica y síndrome mielodisplásico.

65 La LMA o los subtipos de LMA que pueden tratarse utilizando las células que expresan CAR anti-CD123 de la

5 presente invención, pueden ser, en particular, leucemia mieloblástica aguda, leucemia mieloblástica aguda mínimamente diferenciada, leucemia mieloblástica aguda sin maduración, leucemia mieloblástica aguda con maduración granulocítica, leucemia promielocítica o promielocítica aguda (LPA), leucemia mielomonocítica aguda, mielomonocítica junto con eosinofilia de médula ósea, leucemia monoblástica aguda (M5a) o leucemia monocítica aguda (M5b), leucemias eritroides agudas, incluyendo eritroleucemia (M6a) y leucemia eritroide pura (M6b) muy rara, leucemia megacarioblástica aguda, leucemia basófila aguda, panmielosis aguda con mielofibrosis, si intervienen células positivas para CD123.

10 Los subtipos de LMA también incluyen, tricoleucemia, leucemia linfoblástica aguda con cromosoma Filadelfia positivo.

La LMA puede clasificarse como LMA con anomalías genéticas específicas. La clasificación se basa en la capacidad del cariotipo para predecir respuestas a la terapia de inducción, a los riesgos de recaída, a la supervivencia.

15 En consecuencia, la LMA que puede tratarse utilizando las células que expresan CAR anti-CD123 de la presente invención, puede ser LMA con una translocación entre los cromosomas 8 y 21, LMA con una translocación o inversión en el cromosoma 16, LMA con una translocación entre los cromosomas 9 y 11, APL (M3) con una translocación entre los cromosomas 15 y 17, LMA con una translocación entre los cromosomas 6 y 9, LMA con una translocación o inversión en el cromosoma 3, LMA (megacarioblástica) con una translocación entre los cromosomas
20 1 y 22.

La presente invención es particularmente útil para el tratamiento de LMA asociada a estos marcadores citogenéticos particulares.

25 La presente invención también proporciona un linfocito T que expresa un CAR anti-CD123 para el tratamiento de pacientes con subconjuntos citogenéticos específicos de AML, tales como pacientes con t(15; 17)(q22; q21) identificados utilizando ácido holo transretinoico (ATRA) 16-19 y para el tratamiento de pacientes con t(8; 21)(q22; q22) o inv(16)(p13q22)/t(16; 16)(p13; q22) identificados utilizando dosis repetitivas de citarabina a dosis altas.

30 Preferentemente, la presente invención proporciona un linfocito T que expresa un CAR anti-CD123 para el tratamiento de pacientes con aberraciones, tales como -5/del(5q), -7, anomalías de 3q, o un cariotipo complejo, que han demostrado tener tasas de remisión completa y supervivencia inferiores.

35 GRUPOS DE PACIENTES

En una realización preferida, la invención se proporciona para su uso en un tratamiento para la LMA en pacientes mayores de 60 años o en pacientes menores de 20 años.

40 En una realización más preferida, la presente invención se proporciona para su uso en un tratamiento pediátrico, en particular, un tratamiento pediátrico contra la LMA o enfermedades o complicaciones relacionadas con la AML.

Aún en otra realización preferida, la presente invención se proporciona para su uso en un tratamiento en pacientes con LMA con un estado bajo, pobre o desfavorable, es decir, con un índice de supervivencia esperado inferior a 5 años. En este grupo, los pacientes que padecen LMA con las siguientes características citogenéticas: -5; 5q; -7; 7q; 11q23; no t(9;11); inv(3); t(3;3); t(6;9); t(9; 22) se asocian a un estado de riesgo pobre (Byrd JC et al., 15 de diciembre de 2002; Blood: 100 (13)) y están especialmente contemplados para tratarse según la presente invención o con un objeto de la presente invención.

50 En una realización, el linfocito T que expresa un CAR anti-CD123 de la presente invención puede utilizarse como terapia de inducción, como terapia posterior a la remisión de la LMA o como terapia de consolidación en pacientes con LMA. Preferentemente, las células que expresan al menos un CAR anti-CD123 de SEQ ID NO: 1+ SEQ ID NO: 44 son para uso como terapia posterior a la remisión de la LMA o como terapia de consolidación en pacientes con LMA.

55 En una realización, el linfocito T que expresa un CAR anti-CD123 de la presente invención, puede utilizarse en caso de recaída de LMA, o en caso de LMA refractaria o resistente. Preferentemente, las células que comprenden al menos un CAR anti-CD123 de SEQ ID NO: 1+ SEQ ID NO: 44 de la invención, son para su uso en pacientes con recaída de LMA o con LMA refractaria o resistente, más preferentemente, en combinación con al menos otro fármaco contra el cáncer

60 En otra realización preferida, al menos una célula que expresa un CAR anti-CD123 de SEQ ID NO: 1+ SEQ ID NO: 44, es para uso en la prevención del desarrollo de células cancerosas que aparecen, en particular, después de un tratamiento contra el cáncer, durante la depleción de la médula ósea o antes de un trasplante de médula ósea, después de la destrucción de la médula ósea.

65 COMPLICACIONES DE LMA

5 En una realización particular, la invención proporciona un medicamento que mejora el estado de salud de un paciente, en particular, un paciente que padece una complicación relacionada con la LMA. Más preferentemente, dicho linfocito T que expresa un CAR anti-CD123 modificado por ingeniería genética expresa al menos un CAR anti-CD123 de SEQ ID NO: 1+ SEQ ID NO: 44 y es para uso como un medicamento para el tratamiento de una complicación relacionada con LMA.

10 Una complicación o enfermedad relacionada con LMA puede incluir una fase previa de mielodisplasia, leucemia secundaria, en particular LMA secundaria, una cifra alta de leucocitos y ausencia de bastones de Auer. Entre otras, la leucostasis y la afectación del sistema nervioso central (SNC), la hiperleucocitosis, la enfermedad residual, también se consideran como una complicación o enfermedad relacionada con la LMA.

ENFERMEDADES ASOCIADAS A LMA

15 En una realización, la presente invención también proporciona un linfocito T que expresa un CAR anti-CD123 para el tratamiento de una afección patológica relacionada con LMA. Preferentemente, la presente invención proporciona una célula que expresa al menos un CAR anti-CD123 de SEQ ID NO: 1+ SEQ ID NO: 44 para el tratamiento de una afección patológica relacionada con LMA. La presente invención se proporciona para su uso en una terapia para neoplasias mieloides relacionadas con la LMA, para leucemia mieloide aguda y síndrome mielodisplásico, un
20 tratamiento de leucemia mieloide aguda recidivante o refractaria, un tratamiento de leucemia promielocítica aguda recidivante o refractaria en adultos, un tratamiento para la leucemia promielocítica aguda, un tratamiento de leucemia mieloide aguda en adultos mayores de 60 años.

25 Según otro aspecto, la presente invención proporciona una composición para el tratamiento de enfermedades asociadas a LMA, en particular neoplasia maligna hematológica relacionada con LMA.

30 La neoplasia maligna hematológica relacionada con afecciones de LMA incluye síndromes mielodisplásicos (SMD, antes conocido como "preleucemia"), que son una colección diversa de afecciones hematológicas reunidas por una producción ineficaz (o displasia) de células sanguíneas mieloides y el riesgo de transformación a AM.

En otra realización, la invención proporciona un medicamento que mejora el estado de salud de un paciente que padece mieloma múltiple.

35 Otras afecciones patológicas o síndromes genéticos asociados al riesgo de LMA pueden mejorarse con el uso adecuado de la presente invención, dichos síndromes genéticos incluyen síndrome de Down, trisomía, anemia de Fanconi, síndrome de Bloom, Ataxia-telangiectasia, Anemia de Diamond-Blackfan, Síndrome de Schwachman-Diamond, Síndrome de Li-Fraumeni, Neurofibromatosis de tipo 1, neutropenia congénita grave (también denominada síndrome de Kostmann)

40 Otras afecciones patológicas mediadas por CD123

Según otro aspecto, la presente invención proporciona una composición para el tratamiento de enfermedades mediadas por células CD123+. Estas enfermedades mediadas por células CD123+ incluyen inflamación, enfermedades autoinmunitarias.

45 En particular, la presente invención puede utilizarse para el tratamiento de enfermedades mediadas por células CD123+ tales como inflamación de la mucosa gastrointestinal y más particularmente, enfermedades inflamatorias intestinales, alergia nasal, inflamación de la piel, como dermatomiositis juvenil, hematodermia.

50 La presente invención puede ser para su uso como un medicamento para el tratamiento de enfermedades mediadas por células CD123+, tales como enfermedades autoinmunitarias, en particular, enfermedad de Kikushi.

55 Preferentemente, la presente invención es para uso en un tratamiento para una infección recurrente que incluye infección debida a virus tales como el virus de Epstein-Barr, virus del herpes simple, en particular virus oncogénicos, HHV-8, HHV-6, HTLV o VIH, infecciones parasitarias, tales como infección por *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* o *Plasmodium malariae*.

60 En particular, la presente invención proporciona el uso en un tratamiento para la linfadenitis asociada al virus de Epstein-Barr, linfadenitis asociada al virus del herpes simple.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona una composición para el tratamiento de la linfadenitis asociada a lupus eritematoso sistémico, tuberculosis, fibrosis quística, hepatitis, atresia biliar, en particular, hepatitis inducida por virus o atresia biliar en niños, hepatitis autoinmunitaria; cirrosis biliar primaria.

65 Composición que comprende linfocitos T modificados por ingeniería genética según la invención para uso como un medicamento y método

5 La presente divulgación también proporciona una composición para su uso o un método para tratar una enfermedad. En un aspecto, la enfermedad es un cáncer hematológico, en particular, un cáncer de células madre que incluye, pero sin limitación, leucemia (tal como leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia mielógena crónica, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica y síndrome mielodisplásico) y afecciones linfoproliferativas malignas, incluyendo linfoma (tal como mieloma múltiple, linfoma no Hodgkin, linfoma de Burkitt y linfoma folicular de células pequeñas y de células grandes), o una complicación de los mismos.

10 La presente divulgación también proporciona una composición para su uso o un método para inhibir la proliferación o reducir en un paciente una población o actividad de células que expresan CD123. Un método ejemplar incluye poner en contacto una población de células que comprende una célula que expresa CD123 con un linfocito T CAR CD123 de la invención que se une a la célula que expresa CD123.

15 En un aspecto más específico, la presente divulgación proporciona una composición para su uso o un método para inhibir la proliferación o reducir la población de células cancerosas que expresan CD123 en un paciente, comprendiendo los métodos poner en contacto la población de células cancerosas que expresan CD123 con un linfocito T CAR CD123 de la invención que se une a la célula que expresa CD123, unir un linfocito T CAR CD123 de la invención con la célula cancerosa que expresa CD123, dando como resultado la destrucción de las células cancerosas que expresan CD123.

20 En determinados aspectos, el linfocito T CAR CD123 de la invención reduce la cantidad, el número, la cifra o el porcentaje de células y/o de células cancerosas en al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 65 %, al menos 75 %, al menos 85 %, al menos 95 % o al menos 99 % (a un nivel indetectable) en un sujeto con, o modelo animal para, leucemia mieloide u otro cáncer asociado a células que expresan CD123, en relación con un control negativo.

30 La presente divulgación también proporciona una composición para su uso o un método para prevenir, tratar y/o gestionar un trastorno o una afección asociado a células que expresan CD123 (por ejemplo, asociado a un cáncer hematológico), comprendiendo los métodos administrar, a un sujeto que lo necesite, un linfocito T CAR CD123 de la invención que se une a la célula que expresa CD123. En un aspecto, el sujeto es un ser humano. Los ejemplos no limitantes de trastornos asociados a células que expresan CD123 incluyen trastornos autoinmunitarios (tales como lupus), trastornos inflamatorios (tales como alergias, EII y asma) y cánceres (tales como cánceres hematológicos, en particular, LMA o complicaciones de LMA).

35 La presente divulgación también proporciona una composición para su uso o un método para prevenir, tratar y/o gestionar una enfermedad asociada a células que expresan CD123, comprendiendo el método, administrar a un sujeto que lo necesite, un linfocito T CAR CD123 de la invención que se une a la célula que exprese CD123. En un aspecto, el sujeto es un ser humano. Los ejemplos no limitantes de enfermedades asociadas a células que expresan CD123 incluyen leucemia mieloide aguda (LMA), mielodisplasia, leucemia linfocítica aguda de linfocitos B, leucemia linfocítica aguda de linfocitos T, tricoleucemia, neoplasia de células dendríticas plasmacitoides blásticas, leucemia mieloide crónica, linfoma de Hodgkin.

45 La presente divulgación proporciona una composición para su uso o un método para tratar o prevenir una recaída de cáncer asociado a células que expresan CD123, comprendiendo el método, administrar a un sujeto que lo necesite, un linfocito T CAR CD123 de la invención que se une a la célula que exprese CD123. En otro aspecto, los métodos comprenden administrar, al sujeto que lo necesite, una cantidad eficaz de un linfocito T CAR CD123 de la invención que se une a la célula que expresa CD123 en combinación con una cantidad eficaz de otra terapia.

50 En un aspecto, se considera que CD123 es un marcador de "células madre de cáncer" en la LMA. Por lo tanto, un linfocito T CAR CD123 de la invención puede impedir una recaída de LMA, o incluso tratar una LMA que sea principalmente CD123 negativa, aunque con una población de células CD123+ "madre" (células que expresan CD123).

55 En un aspecto, la divulgación proporciona composiciones y métodos para tratar a sujetos que se han sometido a un tratamiento para una enfermedad o un trastorno asociado a niveles de expresión elevados de CD 19, y muestran una enfermedad o un trastorno asociado a niveles elevados de CD123.

60 En un aspecto, la leucemia linfocítica aguda (LLA) de linfocitos B es un ejemplo de enfermedad que requiere un tratamiento en serie utilizando linfocitos T CAR. Por ejemplo, el tratamiento con linfocitos T CAR anti-CD19 a veces puede producir una recaída negativa para CD19, que puede tratarse con los linfocitos T CAR anti-CD123 de la invención. Como alternativa, la presente invención incluye el doble direccionamiento de LLA-B utilizando linfocitos T CAR que comprenden un CAR anti-CD 19 y un CAR anti-CD 123.

65 El tratamiento con las células inmunitarias modificadas por ingeniería genética según la invención puede ser en combinación con una o más terapias contra el cáncer seleccionadas del grupo de terapia con anticuerpos, quimioterapia, terapia con citocinas, terapia con células dendríticas, terapia génica, terapia hormonal, terapia con luz

láser y radioterapia.

Preferentemente, el tratamiento con las células inmunitarias modificadas por ingeniería genética según la invención puede administrarse en combinación con (por ejemplo, antes, simultáneamente o después de) una o más terapias
 5 contra el cáncer seleccionadas de Aracitina, arabinósido de citosina, amsacrina, daunorrubicina, idarrubicina, novantrona, mitoxantrona, vepesid, etopósido (VP16), *trioxido de arsénico*, *ácido transretinoico*, *combinación de trióxido de arsénico*, *ácido transretinoico*, mecloretamina, procarbazona, clorambucilo, y combinaciones de los mismos.

10 Según una realización preferida de la invención, dicho tratamiento puede administrarse en pacientes sometidos a un tratamiento inmunosupresor. De hecho, la presente invención se basa preferentemente en células o en poblaciones de células, que se han hecho resistentes a al menos un agente inmunosupresor debido a la inactivación de un gen que codifica un receptor para dicho agente inmunosupresor. En este aspecto, el tratamiento inmunosupresor debería ayudar a la selección y expansión de los linfocitos T según la invención en el paciente.

15 La administración de las células o de la población de células según la presente invención, puede llevarse a cabo de cualquier manera conveniente, incluyendo inhalación con aerosol, inyección, ingestión, transfusión, implantación o trasplante. Las composiciones descritas en este documento pueden administrarse a un paciente por vía subcutánea, intradérmica, intratumoral, intraganglionar, intramedular, intramuscular, por inyección intravenosa o intralinfática, o
 20 por vía intraperitoneal. En una realización, las composiciones de células de la presente invención se administran preferentemente por inyección intravenosa.

La administración de las células o de las poblaciones de células puede consistir en la administración de 10^4 - 10^9
 25 células por kg de peso corporal, preferentemente de 10^5 a 10^6 células/kg de peso corporal, incluidos todos los valores enteros de números de células dentro de esos intervalos. Las células o población de células pueden administrarse en una o más dosis. En otra realización, dicha cantidad eficaz de células se administra como una sola dosis. En otra realización, dicha cantidad eficaz de células se administra como más de una dosis durante un período de tiempo. El momento de la administración depende del criterio del médico tratante y de la afección clínica del paciente. Las células o población de células pueden obtenerse de cualquier fuente, tal como de un banco de sangre
 30 o de un donante. Aunque las necesidades individuales varían, la determinación de los intervalos óptimos de las cantidades eficaces de un tipo de célula determinado para una enfermedad o afección particular, se incluye dentro de la experiencia de la técnica. Una cantidad eficaz significa una cantidad que proporciona un beneficio terapéutico o profiláctico. La dosis administrada dependerá de la edad, de la salud y del peso del receptor, del tipo de tratamiento concurrente, caso de haberlo, de la frecuencia del tratamiento y de la naturaleza del efecto deseado.

35 En otra realización, dicha cantidad eficaz de células o composición que comprende esas células, se administra por vía parenteral. Dicha administración puede ser una administración intravenosa. Dicha administración puede realizarse directamente mediante inyección dentro de un tumor.

40 En determinadas realizaciones de la presente invención, las células se administran a un paciente junto con (por ejemplo, antes, simultáneamente o después de) cualquier número de modalidades de tratamiento relevantes, incluyendo, pero sin limitación, el tratamiento con agentes tales como terapia antivírica, cidofovir e interleucina-2, citarabina (también conocida como ARA-C) o tratamiento con natalizimab para pacientes con EM o tratamiento con efaliztimab para pacientes con psoriasis u otros tratamientos para pacientes con LMP. Los linfocitos T de la
 45 invención pueden utilizarse en combinación con quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos, u otros agentes inmunoablativos tales como CAMPATH, anticuerpos anti-CD3 u otras terapias con anticuerpos, citoxina, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228, citocinas e irradiación. Estos fármacos inhiben la calcineurina fosfatasa dependiente de calcio (ciclosporina y FK506) o inhiben la cinasa p70S6 que es importante para la señalización inducida por factores de crecimiento (rapamicina) (Henderson, Naya et al. 1991; Liu, Albers et al. 1992; Bierer, Hollander et al. 1993). Las composiciones celulares pueden ser para la administración a un paciente junto
 50 con (por ejemplo, antes, simultáneamente o después de) trasplante de médula ósea, terapia ablativa de linfocitos T utilizando agentes quimioterapéuticos tales como, fludarabina, radioterapia de haz externo (XRT), ciclofosfamida, o anticuerpos tales como OKT3 o CAMPATH. Las composiciones celulares pueden ser para la administración después
 55 de terapia ablativa de linfocitos B, tales como los agentes que reaccionan con CD20, por ejemplo, Rituxan. Por ejemplo, los sujetos pueden someterse a un tratamiento estándar con altas dosis de quimioterapia seguido de trasplante de células madre de sangre periférica. Después del trasplante, los sujetos pueden recibir una infusión de las células inmunitarias expandidas de la presente invención. En una realización adicional, las células expandidas son para su administración antes o después de cirugía.

60 En determinadas realizaciones de la presente invención, las células que expresan CAR anti-CD123 se administran a un paciente junto con (por ejemplo, antes, simultáneamente o después de) un fármaco seleccionado de Aracitina, arabinósido de citosina, amsacrina, daunorrubicina, idarrubicina, novantrona, mitoxantrona, vepesid, etopósido (VP16), *trioxido de arsénico*, *ácido transretinoico*, mecloretamina, procarbazona, clorambucilo, y combinaciones
 65 de los mismos. En estas realizaciones, las células que expresan CAR anti-CD123 pueden ser resistentes al fármaco particular o a la combinación de fármacos que se administra (o administran) junto con células que expresan CAR

anti-CD123.

En otras realizaciones de la presente invención, las células que expresan CAR anti-CD123 son para su administración a un paciente junto con un fármaco seleccionado de citarabina, antraciclinas, 6-tioguanina, hidroxiaurea, prednisona, y combinaciones de las mismas.

Otras definiciones

- A menos que se especifique lo contrario, "uno(a)", "un", "el", "la", y "al menos uno(a)" se usan indistintamente y significan uno(a) o más de uno(a). En el presente documento, los restos de aminoácido en una secuencia polipeptídica se designan según el código de una letra, en donde, por ejemplo, Q significa resto de Gln o de glutamina, R significa resto de Arg o de arginina y D significa resto de Asp o de ácido aspártico.

- Sustitución de aminoácidos significa el reemplazo de un resto de aminoácido por otro, por ejemplo, el reemplazo de un resto de arginina con un resto de glutamina en una secuencia peptídica es una sustitución de aminoácido.

- Los nucleótidos se designan de la siguiente manera: para designar la base de un nucleósido se utiliza el código de una letra: a es adenina, t es timina, c es citosina y g es guanina. Para los nucleótidos degenerados, r representa g o a (nucleótidos de purina), k representa g o t, s representa g o c, w representa a o t, m representa a o c, y representa t o c (nucleótidos de pirimidina), d representa g, a o t, v representa g, a o c, b representa g, t o c, h representa a, t o c, y n representa g, a, t o c.

- Como se usa en el presente documento, "ácido nucleico" o "polinucleótidos" se refiere a nucleótidos y/o polinucleótidos, tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), oligonucleótidos, fragmentos generados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y fragmentos generados por cualquier ligamiento, escisión, acción endonucleasa, y acción exonucleasa. Las moléculas de ácido nucleico pueden estar compuestas por monómeros que son nucleótidos de origen natural (tal como ADN y ARN), o análogos de nucleótidos de origen natural (por ejemplo, formas enantioméricas de nucleótidos de origen natural), o una combinación de ambos. Los nucleótidos modificados pueden tener alteraciones en porciones de azúcar y/o en porciones de bases de pirimidina o purina. Las modificaciones en azúcar incluyen, por ejemplo, el reemplazo de uno o más grupos hidroxilo con halógenos, grupos alquilo, aminas y grupos azido, o los azúcares pueden funcionalizarse como éteres o ésteres. Por otra parte, la porción de azúcar completa puede reemplazarse con estructuras que, desde el punto de vista estérico y electrónico, son similares, tales como aza-azúcares y análogos de azúcares carbocíclicos. Los ejemplos de modificaciones en una porción de bases incluyen purinas y pirimidinas alquiladas, purinas o pirimidinas aciladas, u otros sustitutos heterocíclicos bien conocidos. Los monómeros de ácido nucleico pueden estar unidos por enlaces fosfodiéster o análogos de dichos enlaces. Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios.

- Por receptor antigénico quimérico (CAR) se entiende moléculas que combinan un dominio de unión contra un componente presente en la célula diana, por ejemplo, una especificidad basada en anticuerpos para un antígeno deseado (por ejemplo, un antígeno tumoral) con un dominio intracelular activador de receptores de linfocitos T para generar una proteína quimérica que presenta una actividad inmunitaria celular anti-diana específica. Generalmente, el CAR consta de un anticuerpo monocatenario extracelular (scFv Fc) fusionado con el dominio de señalización intracelular de la cadena zeta del complejo receptor antigénico de linfocitos T (scFv Fc:ζ) y, cuando se expresa en linfocitos T, tiene la capacidad de redirigir el reconocimiento antigénico basándose en la especificidad del anticuerpo monoclonal. Un ejemplo de CAR utilizado en la presente invención es un CAR que se dirige contra el antígeno CD123 y puede comprender, como ejemplo no limitativo, las secuencias de aminoácidos: SEQ ID NO: 23 a 48.

- El término "endonucleasa" se refiere a cualquier enzima de tipo silvestre o variante capaz de catalizar la hidrólisis (escisión) de enlaces entre ácidos nucleicos dentro de una molécula de ADN o ARN, preferentemente una molécula de ADN. Las endonucleasas no escinden la molécula de ADN o ARN independientemente de su secuencia, pero reconocen y escinden la molécula de ADN o ARN en secuencias de polinucleótidos específicas, también se hace referencia a "secuencias diana" o "sitios diana". Por lo general, las endonucleasas pueden clasificarse como endonucleasas de corte raro cuando tienen un sitio de reconocimiento de polinucleótidos con una longitud de más de 12 pares de bases (pb), más preferentemente una longitud de 14-55 pb. Las endonucleasas de corte raro aumentan significativamente la HR induciendo roturas de doble cadena en el ADN (DSB, siglas del inglés *double-strand breaks*) en un locus definido (Perrin, Buckle et al. 1993; Rouet, Smih et al. 1994; Choulika, Perrin et al. 1995; Pingoud y Silva 2007). Las endonucleasas de corte raro pueden ser, por ejemplo, una endonucleasa de asentamiento (Paques y Duchateau 2007), una nucleasa de dedo de cinc (ZFN, siglas del inglés *Zinc-Finger nuclease*) quimérica resultante de la fusión de dominios de dedos de cinc modificados por ingeniería genética con el dominio catalítico de una enzima de restricción tal como FokI (Porteus y Carroll 2005), una endonucleasa Cas9 del sistema CRISPR (Gasiunas, Barrangou et al. 2012; Jinek, Chylinski et al. 2012; Cong, Ran et al. 2013; Mali, Yang et al. 2013) o una endonucleasa química (Eisenschmidt, Lanio et al. 2005; Arimondo, Thomas et al. 2006). En las endonucleasas químicas, un cortador químico o peptídico se conjuga con un polímero de ácidos nucleicos o con otro ADN que reconoce una secuencia diana específica, dirigiendo así la actividad de escisión en una secuencia específica. Las endonucleasas químicas también incluyen nucleasas sintéticas como conjugados de ortofenantrolina,

una molécula de escisión de ADN y oligonucleótidos formadores de triple hélices (TFO, siglas del inglés *triplex-forming oligonucleotides*), que se sabe que se unen a secuencias específicas de ADN (Kalish y Glazer 2005). Dichas endonucleasas químicas están incluidas en el término "endonucleasa" según la presente invención.

5 - Por "nucleasa TALE" (NTALE) se entiende que es una proteína de fusión que consiste en un dominio de unión a ácido nucleico por lo general procedente de un efector de tipo activador de la transcripción (TALE) y un dominio catalítico de nucleasa para escindir una secuencia diana de ácido nucleico. El dominio catalítico es preferentemente un dominio de nucleasa y más preferentemente un dominio que tiene actividad endonucleasa, como por ejemplo I-TevI, ColE7, NucA y Fok-I. En una realización particular, el dominio TALE puede fusionarse con una meganucleasa
 10 como por ejemplo I-CreI y I-OnuI o una variante funcional de las mismas. En una realización más preferida, dicha nucleasa es una Nucleasa TALE monomérica. Una Nucleasa TALE monomérica es una Nucleasa TALE que no requiere dimerización para un reconocimiento y escisión específicos, tales como las fusiones de las repeticiones TAL modificadas por ingeniería genética con el dominio catalítico de I-TevI descritas en el documento WO2012138927. Un efector de tipo activador de la transcripción (TALE) son proteínas de especies bacterianas del género
 15 *Xanthomonas* que comprenden una pluralidad de secuencias repetidas, comprendiendo cada repetición directos en la posición 12 y 13 (RVD) que son específicos para cada base de nucleótido de la secuencia dirigida al ácido nucleico. También pueden obtenerse dominios de unión con propiedades modulares de unión al ácido nucleico base por base (MBBBD, siglas del inglés *modular base-per-base nucleic acid binding*) similares de nuevas proteínas modulares recientemente descubiertas por el solicitante en una especie bacteriana diferente. Las nuevas proteínas
 20 modulares tienen la ventaja de mostrar más variabilidad de secuencia que las repeticiones TAL. Preferentemente, los RVD (siglas del inglés *repeat variable-diresidue*, directos variables de repetición) asociados al reconocimiento de los diferentes nucleótidos son HD que reconocen C, NG que reconocen T, NI que reconocen A, NN que reconocen G o A, NS que reconocen A, C, G o T, HG que reconocen T, IG que reconocen T, NK que reconocen G, HA que reconocen C, ND que reconocen C, HI que reconocen C, HN que reconocen G, NA que reconocen G, SN que reconocen G o A y YG que reconocen T, TL que reconocen A, VT que reconocen A o G y SW que reconocen A. En
 25 otra realización, los aminoácidos críticos 12 y 13 pueden mutarse hacia otros restos de aminoácidos para modular su especificidad hacia los nucleótidos A, T, C y G y, en particular, para mejorar esta especificidad. La nucleasa TALE ya se ha descrito y utilizado para estimular el direccionamiento de genes y modificaciones génicas (Boch, Scholze et al. 2009; Moscou y Bogdanove 2009; Christian, Cermak et al. 2010; Li, Huang et al. 2011). Las nucleasas TAL modificadas por ingeniería genética están disponibles en el comercio con el nombre TALEN™ (Collectis, 8 rue de la Croix Jarry, 75013 París, Francia).

La endonucleasa de corte raro según la presente invención también puede ser una endonucleasa Cas9. Recientemente, se ha desarrollado una nueva herramienta de diseño del genoma basada en la nucleasa Cas9
 35 guiada por ARN (Gasiunas, Barrangou et al., 2012; Jinek, Chylinski et al. 2012; Cong, Ran et al. 2013; Mali, Yang et al. 2013) del sistema inmunoadaptativo CRISPR (grupos de repeticiones palindrómicas cortas en intervalos regulares) procarionota (para una revisión véase (Sorek, Lawrence et al. 2013)). El sistema asociado a CRISPR (Cas, siglas del inglés *CRISPR Associated*) se descubrió primero en bacterias y actúa como defensa contra ADN extraño, ya sea vírico o plasmídico. El diseño del genoma mediado por CRISPR se realiza primero mediante la selección de
 40 la secuencia diana a menudo flanqueada por un motivo de secuencia corta, denominado motivo adyacente al protoespaciador (PAM, siglas del inglés *proto-spacer adjacent motif*). Después de la selección de la secuencia diana, se diseña un crARN específico, complementario a esta secuencia diana. El crARN transactivador (tracrARN) requerido en los sistemas CRISPR de tipo II se emparejan con el crARN y se unen a la proteína Cas9 proporcionada. Cas9 actúa como un anclaje molecular que facilita el emparejamiento de bases de tracrARN con
 45 cARN (Deltcheva, Chylinski et al. 2011). En este complejo ternario, la doble estructura tracrARN:crARN actúa como un ARN guía que dirige la endonucleasa Cas9 a la secuencia diana afín. El reconocimiento de la diana por el complejo Cas9-tracrARN:crARN se inicia analizando la secuencia diana en busca de homología entre la secuencia diana y el crARN. Además de la complementariedad de la secuencia diana-crARN, el direccionamiento al ADN requiere la presencia de un motivo corto adyacente al protoespaciador (motivo adyacente al protoespaciador - PAM).
 50 Después del emparejamiento entre el ARN doble y la secuencia diana, seguidamente Cas9 introduce una rotura bicatenaria roma 3 bases cadena arriba del motivo PAM (Garneau, Dupuis et al., 2010).

La endonucleasa de corte raro puede ser una endonucleasa de asentamiento, también conocida con el nombre de meganucleasa. Estas endonucleasas de asentamiento se conocen bien en la técnica (Stoddard 2005). Las
 55 endonucleasas de asentamiento reconocen una secuencia diana de ADN y generan una rotura mono o bicatenaria. Las endonucleasas de asentamiento son muy específicas, reconocen sitios de ADN que varían de 12 a 45 pares de bases (pb) de longitud, variando generalmente de 14 a 40 pb de longitud. La endonucleasa de asentamiento según la invención puede corresponder, por ejemplo, a una endonucleasa LAGLIDADG, a una endonucleasa HNH, o a una endonucleasa GIY-YIG. La endonucleasa de asentamiento preferida según la presente invención puede ser una
 60 variante de I-CreI.

- Por "vector de suministro" o "vectores de suministro" se entiende cualquier vector de suministro que pueda utilizarse en la presente invención para poner en contacto la célula (es decir, "contactar") o suministrar dentro de las células o compartimentos subcelulares (es decir, "introducir") agentes/productos químicos y moléculas (proteínas o ácidos nucleicos) necesarios en la presente invención. Incluye, pero sin limitación, vectores de suministro liposomal, vectores de suministro vírico, vectores de suministro de fármacos, portadores químicos, portadores poliméricos,
 65

lipocomplejos, policomplejos, dendrímeros, microburbujas (agentes de contraste de ultrasonido), nanopartículas, emulsiones u otros vectores de transferencia apropiados. Estos vectores de suministro permiten suministrar moléculas, sustancias químicas, macromoléculas (genes, proteínas), u otros vectores tales como plásmidos, péptidos desarrollados por Diatos. En estos casos, los vectores de suministro son portadores de moléculas. Por

5 "vector de suministro" o "vectores de suministro" también se entiende que son métodos de suministro para realizar la transfección.

- Los términos "vector" o "vectores" se refieren a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un "vector" en la presente invención incluye, pero sin limitación, un vector vírico, un plásmido, un vector de ARN o una molécula de ADN o ARN lineal o circular que puede consistir en un ácido nucleico cromosómico, no cromosómico, semisintético o sintético. Los vectores preferidos son aquellos capaces de replicación autónoma (vector episomal) y/o expresión de ácidos nucleicos a los que están unidos (vectores de expresión). Los expertos en la técnica conocen un gran número de vectores adecuados y están disponibles en el

10 comercio.

Los vectores víricos incluyen retrovirus, adenovirus, parvovirus (por ejemplo, virus adenoasociados), coronavirus, virus de ARN de cadena negativa, como el ortomixovirus (por ejemplo, virus de la gripe), rabdovirus (por ejemplo, virus de la rabia y de la estomatitis vesicular), paramixovirus (por ejemplo, sarampión y Sendai), virus de ARN de cadena positiva como el picornavirus y el alfavirus, y virus de ADN bicatenario que incluyen adenovirus, herpesvirus (por ejemplo, virus del herpes simple tipos 1 y 2, virus de Epstein-Barr, citomegalovirus) y poxvirus (por ejemplo, virus de la variolovacuna, de la viruela aviar y de la viruela del canario). Otros virus incluyen el virus de Norwalk, togavirus, flavivirus, reovirus, papovavirus, hepadnavirus y virus de la hepatitis, por ejemplo. Los ejemplos de retrovirus incluyen: virus de la leucosis - sarcoma aviar, virus de mamífero de tipo C, de tipo B, de tipo D, grupo HTLV-BLV, lentivirus, espumavirus (Coffin, J. M., *Retroviridae: The viruses and their replication*, In *Fundamental Virology*, Tercera Edición, B. N. Fields, et al., Eds., Lippincott-Raven Publishers, Filadelfia, 1996).

15 20 25

- Por "vector de lentivirus" se entiende vectores de lentivirus basados en VIH que son muy prometedores para el suministro de genes debido a su capacidad de empaquetamiento relativamente grande, inmunogenicidad reducida y a su capacidad para transducir de forma estable con alta eficacia una amplia gama de diferentes tipos de células. Los vectores de lentivirus generalmente se generan después de la transfección transitoria de tres (empaquetamiento, envoltura y transferencia) o más plásmidos en células productoras. Al igual que el VIH, los vectores de lentivirus entran en la célula diana a través de la interacción de glicoproteínas de la superficie vírica con receptores en la superficie celular. En la entrada, el ARN vírico sufre transcripción inversa, que está mediada por el complejo de transcriptasa inversa vírico. El producto de la transcripción inversa es un ADN vírico lineal bicatenario, que es el sustrato para la integración vírica en el ADN de las células infectadas. Por "vectores de lentivirus (o VL) integradores", se entiende, como ejemplo no limitante, vectores que son capaces de integrarse en el genoma de una célula diana. Al contrario, por "vectores de lentivirus no integradores (o VLNI)" se entiende que son vectores eficaces de suministro de genes que no se integran el genoma de una célula diana a través de la acción de la integrasa del virus.

30 35 40

- Los vectores de suministro y los vectores pueden asociarse o combinarse con cualquier técnica de permeabilización celular, tal como la sonoporación o electroporación o derivados de estas técnicas.

- Por célula o células se entiende cualquier célula viva eucariota, células primarias y líneas celulares procedentes de estos organismos para el cultivo *in vitro*.

45

- Por "célula primaria" o "células primarias" se entiende células tomadas directamente de tejido vivo (es decir, material de biopsia) y establecidas para el crecimiento *in vitro*, que han sufrido muy pocas duplicaciones poblacionales y, por lo tanto, son más representativas de los principales componentes funcionales y características de los tejidos de los que proceden, en comparación con las líneas celulares tumorigénicas o inmortalizadas artificialmente continuas.

50

Como ejemplos no limitativos, las líneas celulares pueden seleccionarse del grupo que consiste en células CHO-K1; células HEK293; células Caco2; células U2-OS; células NIH 3T3; células NSO; células SP2; células CHO; células DG44; células K-562, células U-937; células MRC5; células IMR90; células Jurkat; células HepG2; células HeLa; células HT-1080; células HCT-116; células Hu-h7; células Huvec; células Molt 4.

55

Todas estas líneas celulares pueden modificarse mediante el método de la presente invención para proporcionar modelos de líneas celulares para producir, expresar, cuantificar, detectar, estudiar un gen o una proteína de interés; estos modelos también pueden utilizarse para detectar moléculas de interés biológicamente activas en investigación y producción y en varios campos, tal como el de las sustancias químicas, biocombustibles, agentes terapéuticos y en agronomía, como ejemplos no limitantes.

60

- Por "mutación" se entiende la sustitución, delección, inserción de hasta uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, veinte, veinticinco, treinta, cuarenta, cincuenta o más nucleótidos/aminoácidos en un polinucleótido (ADNc, gen) o una secuencia polipeptídica. La mutación puede afectar

65

a la secuencia codificante de un gen o su secuencia reguladora. También puede afectar a la estructura de la secuencia genómica o a la estructura/estabilidad del ARNm codificado.

5 - Por "variante(s)", se entiende una variante de repetición, una variante, una variante de unión al ADN, una variante de nucleasa TALE, una variante polipeptídica obtenida por mutación o reemplazo de al menos un resto en la secuencia de aminoácidos de la molécula precursora.

10 - Por "variante funcional" se entiende un mutante catalíticamente activo de una proteína o de un dominio de proteína; dicho mutante puede tener la misma actividad en comparación con su proteína precursora o dominio de proteína o propiedades adicionales, o mayor o menor actividad.

15 - "Identidad" se refiere a la identidad de secuencia entre dos moléculas de ácido nucleico o polipéptidos. La identidad puede determinarse comparando una posición en cada secuencia que puede alinearse con fines de comparación. Cuando una posición en la secuencia comparada está ocupada por la misma base, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. Un grado de similitud o identidad entre las secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos es una función del número de nucleótidos idénticos o coincidentes en las posiciones compartidas por las secuencias de ácido nucleico. Para calcular la identidad entre dos secuencias, pueden utilizarse varios algoritmos y/o programas de alineamiento, incluyendo FASTA o BLAST, que están disponibles como parte del paquete de análisis de secuencia GCG (Universidad de Wisconsin, Madison, Wis.), y pueden utilizarse, por ejemplo, con parámetros predeterminados. Por ejemplo, se contemplan polipéptidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 70 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % con polipéptidos específicos descritos en el presente documento y que muestran con preferencia sustancialmente las mismas funciones, así como polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos.

25 - La "similitud" describe la relación entre las secuencias de aminoácidos de dos o más polipéptidos. BLASTP también puede utilizarse para identificar una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 87,5 %, 90 %, 92,5 %, 95 %, 97,5 %, 98 %, 99 % de similitud de secuencia con una secuencia de aminoácidos de referencia utilizando una matriz de similitud tal como BLOSUM45, BLOSUM62 o BLOSUM80. A menos que se indique lo contrario, la puntuación de similitud se basará en el uso de BLOSUM62. Cuando se usa BLASTP, el porcentaje de similitud se basa en la puntuación positiva de BLASTP y el porcentaje de identidad de secuencia se basa en la puntuación de identidades de BLASTP. Las "Identidades" de BLASTP muestran el número y la fracción del total de restos en los pares de secuencias con alta puntuación que son idénticos; y la puntuación "Positiva" de BLASTP muestra el número y la fracción de restos para los cuales las puntuaciones de alineación tienen valores positivos y que son similares entre sí. Las secuencias de aminoácidos que tienen estos grados de identidad o similitud o cualquier grado intermedio de identidad de similitud con las secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento se contemplan e incluyen en esta descripción. Las secuencias de polinucleótidos de polipéptidos similares se deducen utilizando el código genético y pueden obtenerse por medios convencionales. Por ejemplo, una variante funcional de pTalfa puede tener un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 87,5 %, 90 %, 92,5 %, 95 %, 97,5 %, 98 %, 99% de similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 107. Un polinucleótido que codifica dicha variante funcional se produciría mediante la traducción inversa de su secuencia de aminoácidos utilizando el código genético.

45 - "Dominio de transducción de señal" o "ligando coestimulador" se refiere a una molécula en una célula presentadora de antígenos que se une específicamente a una molécula coestimuladora afín en un linfocito T, proporcionando de este modo una señal que, además de la señal primaria proporcionada, por ejemplo, a través de la unión de un complejo de TCR/CD3 con una molécula del MHC cargada con péptido, actúa como mediadora en una respuesta de linfocitos T, incluyendo, pero sin limitación, activación de proliferación, diferenciación y similares. Un ligando coestimulador puede incluir, pero sin limitación, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, un ligando coestimulador inducible (ICOS-L), una molécula de adhesión intercelular (ICAM, CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, M1CB, HVEM, receptor de linfotóxina beta, 3/TR6, ILT3, ILT4, un agonista o anticuerpo que se une al receptor de ligando Toll y un ligando que se une específicamente con B7-H3. Un ligando coestimulador también incluye, entre otros, un anticuerpo que se une específicamente con una molécula coestimuladora presente en un linfocito T, tal como, pero sin limitación, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno 1 asociado a la función de linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LTGHT, NKG2C, B7-H3, un ligando que se une específicamente con CD83.

60 Una "molécula coestimuladora" se refiere al compañero de unión afín en un linfocito T que se une específicamente con un ligando coestimulador, actuando así como mediadora en una respuesta coestimuladora en la célula, tal como, pero sin limitación, proliferación. Las moléculas coestimuladoras incluyen, pero sin limitación, una molécula del MHC de clase I, BTLA y un receptor de ligando de Toll.

Una "señal coestimuladora" como se usa en este documento se refiere a una señal, que en combinación con una señal primaria, tal como ligamiento de TCR/CD3, conduce a la proliferación de linfocitos T y/o a la regulación positiva o negativa de moléculas clave.

65 La expresión "dominio de unión a ligando extracelular", como se usa en el presente documento, se define como un

oligo o polipéptido que es capaz de unirse a un ligando. Preferentemente, el dominio será capaz de interactuar con una molécula de la superficie celular. Por ejemplo, el dominio de unión a ligando extracelular puede seleccionarse para que reconozca un ligando que actúe como un marcador de superficie celular en células diana asociadas a una patología particular. Por tanto, los ejemplos de marcadores de superficie celular que pueden actuar como ligandos incluyen los asociados con infecciones causadas por virus, bacterias y parásitos, enfermedades autoinmunitarias y células cancerosas.

El término "sujeto" o "paciente", como se usa en el presente documento, incluye a todos los miembros del reino animal, incluidos los primates no humanos y los seres humanos.

El término "recidivante" se refiere a una situación en la que un sujeto o un mamífero, quien ha tenido una remisión de cáncer después de una terapia tiene un retorno de células cancerosas.

La expresión "refractario o resistente" se refiere a una circunstancia en la que un sujeto o un mamífero, incluso después de un tratamiento intensivo, tiene células cancerosas residuales en su cuerpo.

La expresión "resistencia a fármacos" se refiere a la situación en la que una enfermedad no responde al tratamiento con uno o más fármacos. La resistencia al fármaco puede ser intrínseca (o resistencia primaria), lo que significa que la enfermedad nunca ha respondido al fármaco, o fármacos, o puede ser adquirida, lo que significa que la enfermedad deja de responder a uno o más fármacos a los que la enfermedad había respondido anteriormente (resistencia secundaria). En ciertas realizaciones, la resistencia al fármaco es intrínseca. En ciertas realizaciones, la resistencia al fármaco es adquirida.

La expresión "neoplasia maligna hematológica" o "cáncer hematológico" se refiere a un cáncer de la médula ósea y/o tejido linfático del cuerpo. Como ejemplos de neoplasias malignas hematológicas se incluyen, por ejemplo, mielodisplasia, leucemia, linfomas, tales como linfomas cutáneos, linfoma no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin (también denominada linfoma de Hodgkin) y mieloma, tal como la leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia promielocítica aguda (LPA), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mieloide crónica (LMC), leucemia neutrofilica crónica (LNC), leucemia indiferenciada aguda (LIA), linfoma anaplásico de células grandes (LACG), leucemia prolinfocítica (LPL), leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ), LLA de linfocitos T en adulto, LMA con mielodisplasia de tres linajes (LMA/TMDS), leucemia de linaje mixto (LLM), síndromes mielodisplásicos (SMD), trastornos mieloproliferativos (TMP) y mieloma múltiple (MM).

El término "leucemia" se refiere a neoplasias malignas de los tejidos formadores de sangre, incluyendo, pero sin limitación, leucemia linfocítica crónica o leucemia linfocítica crónica, leucemia mielocítica crónica o leucemia mielógena crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda o leucemia mielógena aguda (LMA) y leucemia mieloblástica aguda.

La descripción de la invención, escrita anteriormente, proporciona una manera y un proceso para realizarla y utilizarla de tal manera que cualquier experto en esta materia pueda fabricarla y utilizarla, proporcionándose esta implementación en particular para la materia objeto de las reivindicaciones adjuntas, que constituyen una parte de la descripción original.

Cuando en el presente documento se indique un límite o un intervalo numérico, se incluyen los extremos. Asimismo, todos los valores y subintervalos dentro de un límite o intervalo numérico se incluyen específicamente como si se escribieran explícitamente.

Habiendo descrito la presente invención en general, se puede obtener una comprensión adicional por referencia a ciertos ejemplos específicos, que se proporcionan en el presente documento con fines únicamente ilustrativos y no pretenden ser limitativos a menos que se especifique lo contrario.

MÉTODO GENERAL

- Cultivos de linfocitos T primarios

Los linfocitos T se purificaron de muestras de capa leucocitaria proporcionadas por el EFS (Etablissement Français du Sang, París, Francia) utilizando medio de densidad de gradiente Ficoll. La capa de CMSP (células mononucleares de sangre periférica) se recuperó y los linfocitos T se purificaron utilizando un kit de enriquecimiento de linfocitos T disponible en el comercio. Los linfocitos T purificados se activaron en medio X-Vivo™-15 (Lonza) complementado con IL-2 humana 20 ng/ml, suero humano al 5 % y activador de linfocitos T CD3/CD28 humanos con Dynabeads a una relación de perlas:células de 1: 1 (Life Technologies).

- Transfección de ARNm de CAR

Las transfecciones se realizaron el día 4 o el día 11 después de la purificación y activación de los linfocitos T. Se transfectaron 5 millones de células con 15 µg de ARNm que codificaba las diferentes construcciones de CAR. Los

ARNm de CAR se produjeron utilizando transfecciones de ARNm polimerasa de T7 realizadas con tecnología Cytopulse, aplicando dos pulsos de 0,1 mS a 3 000 V/cm seguido de cuatro pulsos de 0,2 mS a 325 V/cm en cubetas con un espacio de 0,4 cm en un volumen final de 200 µl de "tampón T Cytoporation" (Aparato BTX Harvard). Las células se diluyeron inmediatamente en medio X-Vivo™-15 y se incubaron a 37 °C con CO₂ al 5 %. Dos horas después de la electroporación, se añadió IL-2 a 20 ng/ml.

- Ensayo de desgranulación (movilización de CD107a)

Los linfocitos T se incubaron en placas de 96 pocillos (40 000 células/pocillo), junto con una misma cantidad de células que expresaban varios niveles de proteína CD123. Los co-cultivos se mantuvieron en un volumen final de 100 µl de medio X-Vivo™-15 (Lonza) durante 6 horas a 37 °C con CO₂ al 5 %. La tinción de CD107a se realizó durante la estimulación celular, mediante la adición de un anticuerpo anti-CD107a fluorescente al comienzo del co-cultivo, junto con 1 µg/ml de anti-CD49d, 1 µg/ml de anti-CD28 y solución de Monensina 1x. Después de un período de incubación de 6 h, las células se tiñeron con un colorante de viabilidad fijable y anti-CD8 conjugado con fluorocromo y se analizaron mediante citometría de flujo. La actividad de desgranulación se determinó como el % de células CD8+/CD107a+, y determinando la señal de intensidad de fluorescencia media (IFM) para la tinción de CD107a entre células CD8+. Los ensayos de desgranulación se realizaron 24 h después de la transfección de ARNm.

- Ensayo de liberación de IFN gamma

Los linfocitos T se incubaron en placas de 96 pocillos (40 000 células/pocillo), junto con líneas celulares que expresaban varios niveles de la proteína CD123. Los co-cultivos se mantuvieron en un volumen final de 100 µl de medio X-Vivo™-15 (Lonza) durante 24 horas a 37 °C con CO₂ al 5 %. Después de este período de incubación, las placas se centrifugaron a 1 500 rpm durante 5 minutos y los sobrenadantes se recuperaron en una nueva placa. La detección de IFN gamma en los sobrenadantes de los cultivos celulares se realizó mediante un ensayo ELISA. Los ensayos de liberación de IFN gamma se realizaron iniciando los co-cultivos celulares 24 h después de la transfección de ARNm.

- Ensayo de citotoxicidad

Los linfocitos T se incubaron en placas de 96 pocillos (100 000 células/pocillo), junto con 10 000 células diana (que expresaban CD123) y 10 000 células de control (CD123neg) en el mismo pocillo. Las células diana y las de control se marcaron con colorantes intracelulares fluorescentes (CFSE o violeta Cell Trace) antes de cultivarlas conjuntamente con los linfocitos T CAR+. Los co-cultivos se incubaron durante 4 horas a 37 °C con CO₂ al 5 %. Después de este período de incubación, las células se marcaron con un colorante de viabilidad fijable y se analizaron mediante citometría de flujo. Se determinó la viabilidad de cada población celular (células diana o células de control CD123neg) y se calculó el % específico de lisis celular. Los ensayos de citotoxicidad se realizaron 48 h después de la transfección de ARNm.

- Transducción de linfocitos T

La transducción de linfocitos T con vectores de lentivirus recombinantes para la expresión de CAR, se realizó tres días después de la purificación/activación de los linfocitos T. La detección de CAR en la superficie de los linfocitos T se realizó utilizando una proteína recombinante que consistía en la fusión del dominio extracelular de la proteína CD123 humana, junto con un fragmento de Fc de IgG1 de murino. La unión de esta proteína con la molécula CAR se detectó con un anticuerpo secundario conjugado con fluorocromo que se dirige a la parte Fc de la proteína de ratón, y se analizó mediante citometría de flujo.

- Modelo de ratón antitumoral

Como un modelo de ratón de xenoinjerto de LMA, a ratones NOG inmunodeficientes se les inyectó por vía intravenosa (iv) células MOLM13-Luciferasa que expresaban CD123. Opcionalmente, los ratones recibieron un tratamiento contra el cáncer. Después, a los ratones se les inyectó por vía iv (ya sea 2 o 7 días después de la inyección de la línea de células tumorales) diferentes dosis de linfocitos T CAR+ a analizar, o linfocitos T que no se transdujeron con el vector de lentivirus CAR. Las señales bioluminiscentes se determinaron el día de la inyección de los linfocitos T (DO), en D7, 14, 21, 28 y 40 después de la inyección de linfocitos T para seguir la progresión tumoral en los diferentes animales.

Ejemplos

Ejemplo 1: Proliferación de células inactivadas con TCRalfa que expresan un CAR CD123.

Se diseñaron y produjeron nucleasas TALE heterodiméricas que se dirigían a dos secuencias de 17 pb de longitud (denominadas semidianas) separadas por un espaciador de 15 pb dentro del gen de la región de la cadena constante alfa del receptor de linfocitos T (TRAC). Cada semidiana se reconoce mediante repeticiones de las

seminucleasas TALE enumeradas en la Tabla 10.

Tabla 10: Nucleasas TAL dirigidas al gen TCRalfa

Diana	Secuencia diana	Secuencia de repetición	Seminucleasas TALE
TRAC_T01	TTGTCCCACAGATATCC Agaaccctgaccctg	TRAC_T01-L de repetición (SEQ ID NO: 50)	NTALE TRAC_T01-L (SEQ ID NO: 52)
	CCGTGTACCAGCTGAGA (SEQ ID NO: 49)	TRAC_T01-R de repetición (SEQ ID NO: 51)	NTALE TRAC_T01-R (SEQ ID NO: 53)

5 Cada construcción de nucleasa TALE se subclonó utilizando digestión con enzimas de restricción en un vector de expresión de mamífero bajo el control del promotor de T7. El ARNm que codifica la secuencia genómica de TRAC que escinde la nucleasa TALE se sintetizó a partir del plásmido que llevaba la secuencia codificante cadena abajo del promotor de T7.

10 Linfocitos T purificados, preactivados durante 72 horas con perlas recubiertas con antiCD3/CD28, se transfectaron con cada uno de los 2 ARNm que codificaban ambas seminucleasas TALE TRAC_T01. Cuarenta y ocho (48) horas después de la transfección, diferentes grupos de linfocitos T del mismo donante se transdujeron respectivamente con un vector lentivírico que codificaba uno de los CAR CD-123 descritos anteriormente (SEQ ID NO: 23 a 48). Dos (2) días después de la transducción, las células CD3neg se purificaron utilizando perlas magnéticas anti-CD3 y 5 días después de la transducción las células se reactivaron con anti-CD28 soluble (5 µg/ml).

La proliferación celular se siguió hasta 30 días después de la reactivación contando las células 2 veces a la semana. En comparación con las células no transducidas, se observó un aumento de la proliferación en células inactivadas con TCR alfa que expresaban los CAR CD-123, especialmente cuando se reactivaban con anti-CD28.

20 Para investigar si los linfocitos T humanos expresaban el estado activado de presentación de CAR CD123, se analizó la expresión del marcador de activación CD25 mediante FACS, 7 días después de la transducción. Las células purificadas transducidas con el vector lentivírico que codificaba el CAR CD-123, se sometieron a ensayo para determinar la expresión de CD25 en su superficie para evaluar su activación en comparación con las células no transducidas. Se esperaba expresión aumentada de CD25 en condiciones tanto de reactivación como de no reactivación de CD28.

EJEMPLO 2:

30 **Construcción de CAR CD123 utilizando varios fragmentos de anticuerpos anti-CD123**

- Cultivos de linfocitos T primarios

35 Los linfocitos T se purificaron de muestras de capa leucocitaria proporcionadas por el EFS (Etablissement Français du Sang, París, Francia) utilizando un medio de densidad de gradiente Ficoll (Ficoll Paque PLUS/GE Healthcare Life Sciences). La capa de CMSP se recuperó y los linfocitos T se purificaron utilizando un kit de enriquecimiento de linfocitos T disponible en el comercio (Stem Cell Technologies). Los linfocitos T purificados se activaron en medio X-Vivo™-15 (Lonza) complementado con IL-2 humana 20 ng/ml (Miltenyi Biotec), suero humano al 5 % (Sera Laboratories) y activador de linfocitos T CD3/CD28 humanos con Dynabeads a una relación de perlas:células de 1: 1 (Life Technologies). Después de la activación, las células se cultivaron y se mantuvieron en medio X-Vivo™-15 (Lonza) complementado con IL-2 humana 20 ng/ml (Miltenyi Biotec) y suero humano al 5 % (Sera Laboratories)

- Transfección de ARNm de CAR

45 Las transfecciones se realizaron el día 4 o el día 11 después de la purificación y activación de los linfocitos T. Se transfectaron 5 millones de células con 15 µg de ARNm que codificaba las diferentes construcciones de CAR. Los ARNm de CAR se produjeron utilizando el kit mMESAGE mMACHINE T7 (Life Technologies) y se purificaron utilizando columnas RNeasy Mini Spin (Qiagen). Las transfecciones se realizaron utilizando tecnología Cytopulse, aplicando dos pulsos de 0,1 mS a 3 000 V/cm seguido de cuatro pulsos de 0,2 mS a 325 V/cm en cubetas con un espacio de 0,4 cm en un volumen final de 200 µl de "tampón T Cytoporation" (Aparato BTX Harvard). Las células se diluyeron inmediatamente en medio X-Vivo™-15 (Lonza) y se incubaron a 37 °C con CO₂ al 5 %. Dos (2) horas después de la electroporación, se añadió IL-2 (de Miltenyi Biotec) a 20 ng/ml.

- Ensayo de desgranulación (movilización de CD107a)

55 Los linfocitos T se incubaron en placas de 96 pocillos (40 000 células/pocillo), junto con una misma cantidad de células que expresaban o no la proteína CD123. Los co-cultivos se mantuvieron en un volumen final de 100 µl de

medio X-Vivo™-15 (Lonza) durante 6 horas a 37 °C con CO₂ al 5 %. La tinción de CD107a se realizó durante la estimulación celular, mediante la adición de un anticuerpo anti-CD107a fluorescente (conjugado con APC, de Miltenyi Biotec) al comienzo del co-cultivo, junto con 1 µg/ml de anti-CD49d (BD Pharmingen), 1 µg/ml de anti-CD28 (Miltenyi Biotec) y solución de Monensina 1x (eBioscience). Después de un período de incubación de 6 h, las células se tiñeron con un colorante de viabilidad fijable (eFluor 780, de eBioscience) y anti-CD8 conjugado con fluorocromo (Miltenyi Biotec conjugado con PE) y se analizaron mediante citometría de flujo. La actividad de desgranulación se determinó como el % de células CD8+/CD107a+, y determinando la señal de intensidad de fluorescencia media (IFM) para la tinción de CD107a entre células CD8+. Los ensayos de desgranulación se realizaron 24 h después de la transfección de ARNm.

- Ensayo de liberación de IFN γ

Los linfocitos T se incubaron en placas de 96 pocillos (40 000 células/pocillo), junto con líneas celulares que expresaban o no la proteína CD123. Los cocultivos se mantuvieron en un volumen final de 100 µl de medio X-Vivo™-15 (Lonza) durante 24 horas a 37 °C con CO₂ al 5 %. Después de este período de incubación, las placas se centrifugaron a 1 500 rpm durante 5 minutos y los sobrenadantes se recuperaron en una nueva placa. La detección de IFN γ en los sobrenadantes de los cultivos celulares se realizó mediante un ensayo ELISA (kit ELISA Quantikine de IFN- γ humano, de R&D Systems). Los ensayos de liberación de IFN γ se realizaron iniciando los co-cultivos celulares 24 h después de la transfección de ARNm.

- Ensayo de citotoxicidad

Los linfocitos T se incubaron en placas de 96 pocillos (100 000 células/pocillo), junto con 10 000 células diana (que expresaban CD123) y 10 000 células de control (CD123neg) en el mismo pocillo. Las células diana y las de control se marcaron con colorantes intracelulares fluorescentes (CFSE o violeta Cell Trace, de Life Technologies) antes de cultivarlas conjuntamente con los linfocitos T CAR+. Los co-cultivos se incubaron durante 4 horas a 37 °C con CO₂ al 5 %. Después de este período de incubación, las células se marcaron con un colorante de viabilidad fijable (eFluor 780, de eBioscience) y se analizaron mediante citometría de flujo. Se determinó la viabilidad de cada población celular (células diana o células de control CD123neg) y se calculó el % específico de lisis celular. Los ensayos de citotoxicidad se realizaron 48 h después de la transfección de ARNm.

RESULTADOS

Para generar receptores antigénicos quiméricos (CAR) y para explorar su actividad de desgranulación hacia células CD123+, se utilizaron 6 scFv diferentes de 7G3, 32716, Klon 43 12F1, 26292 y Old4.

Se diseñaron diferentes arquitecturas (Figura 2 y Figura 3) y su actividad se determinó después de la expresión transitoria en linfocitos T humanos (Figura 5, Figura 6, Figura 7 y Figura 8).

Los linfocitos T se purificaron de muestras de capa leucocitaria y se activaron utilizando perlas de CD3/CD28. Cuatro (4) días después de la activación, las células se transfectaron con los ARNm que codificaban las diferentes moléculas CAR (utilizando electroporación PulseAgile) y 24 h después de la transfección se evaluó la actividad de desgranulación.

Los resultados ilustrados en las **Figuras 4 y 5** muestran la actividad de desgranulación de los 6 scFv diferentes de una sola arquitectura (v3: CD8-bisagra/CD8-transmembrana), cuando los linfocitos T CAR+ se cultivaron conjuntamente durante 6 horas con células que expresaban CD123 (RPMI8226), o con células que no expresaban CD123 (K562). Las barras blancas corresponden a señales de desgranulación observadas en linfocitos T que se cultivaron solos, las barras negras representan las señales observadas cuando los linfocitos T se cultivaron conjuntamente con células RPMI8226 y las barras grises muestran las señales de desgranulación de los linfocitos T cultivados conjuntamente con células K562.

La **figura 4** muestra la actividad de desgranulación en porcentaje (%) de la desgranulación de los 6 scFv diferentes de una sola arquitectura (v3: CD8-bisagra/CD8-transmembrana), cuando los linfocitos T CAR+ se cultivaron conjuntamente durante 6 horas con células que expresaban CD123 (RPMI8226), o con células que no expresaban CD123 (K562).

La **figura 5** muestra la actividad de desgranulación (linfocitos CD107a+) en intensidad de fluorescencia media (IFM) de linfocitos T CAR después de 6 h de cultivo conjunto con linfocitos CD123neg (K562) o con linfocitos que expresan niveles altos o bajos de CD123 (RPMI8226 y KG1a, respectivamente). Los resultados representan los valores medios de tres experimentos independientes.

Sorprendentemente, los resultados muestran que, aunque 7G3 es un anticuerpo anti-CD123 que muestra una fuerte afinidad y avidéz y eficacia *in vivo* (Jin et al., 2009; Cell Stem Cell 5, 31-42), los linfocitos T CAR CD123 procedentes de 7G3, no eran activos en la presente configuración experimental.

Las células que expresaban CAR de 26292, 32716 y Klon43, mostraron una fuerte actividad en comparación con el

control ficticio, siendo las células que expresaban el CAR de Klon43 las más activas.

Curiosamente, mientras que las células que expresan CAR 26292 y las células que expresan CAR 32716 fueron ligeramente activas hacia células que no expresan CD123 (K562) (barras grises), la actividad de las células que no

5 expresan CD123 hacia Klon43 fue comparable a la de los linfocitos T ficticios. Entre las moléculas de CAR generadas como se ilustra en la figura 2, 8 de ellas se seleccionaron para realizar ensayos de actividad adicionales (figura 6, figura 7 y figura 8).

10 **Construcción de CAR CD123 utilizando fragmentos de anticuerpo scFv anti-CD123 procedentes de Klon43, 12F1, 32716 y 26292, y análisis funcional**

Para ello, linfocitos T se aislaron de muestras de capa leucocitaria y se activaron utilizando perlas de CD3/CD28. Las células se transfectaron transitoriamente con los ARNm que codificaban los diferentes candidatos en DII después de la activación. La actividad CAR se evaluó midiendo su capacidad de desgranulación, la liberación de IFN gamma y la

15 actividad citotóxica cuando se cultivan conjuntamente con células que expresan o no CD123.

La **figura 6** muestra la actividad de desgranulación (linfocitos CD107a+) de linfocitos T CAR después de 6 h de cultivo conjunto con linfocitos CD123neg (K562) o con linfocitos que expresaban niveles altos o bajos de CD123 (RPMI8226 y KG1a, respectivamente). Los co-cultivos se iniciaron 24 h después de la electroporación de ARNm de

20 CAR. Los resultados representan los valores medios de tres experimentos independientes.

La **figura 7** muestra la cantidad de IFN gamma liberada por los linfocitos T cuando se cultivan conjuntamente durante 24 horas con células que expresan diferentes niveles de CD123 (KG1a o RPMI8226), o con células que no expresan CD123 (K562). También se muestra, la liberación de IFN gamma de los linfocitos T cultivados solos, en las mismas condiciones que los cocultivos. Los experimentos se realizaron con tres donantes independientes, y aquí se muestran los resultados de un donante representativo.

25

La **figura 8** muestra la actividad citolítica específica de linfocitos T CAR. Los ensayos se realizaron 48 h después de la transfección de ARNm de CAR. Los linfocitos T se cultivaron conjuntamente con células K562+KG1a o K562+RPMI8226 durante 4 horas. Al final del cocultivo, se determinó la viabilidad celular de cada una de las líneas celulares y se calculó un porcentaje específico de lisis celular.

30

Todas las construcciones eran activas, presentando el CAR de Klon 43 V3 y el CAR 32716V3 la mayor actividad en comparación con el control que otros CARS.

35

- Transducción de linfocitos T

La transducción de linfocitos T con vectores de lentivirus recombinantes para la expresión de CAR, se realizó tres días después de la purificación/activación de los linfocitos T. Los vectores de lentivirus se produjeron en Vectalys SA (Toulouse, Francia) mediante transfección de plásmidos genómicos y auxiliares en células HEK-293. Las transducciones se realizaron a una multiplicidad de infección de 5, utilizando 10^6 células por transducción. La detección de CAR en la superficie de los linfocitos T se realizó utilizando una proteína recombinante que consistía en la fusión del dominio extracelular de la proteína CD123 humana junto con un fragmento de Fc de IgG1 de murino (producido por LakePharma). La unión de esta proteína con la molécula CAR se detectó con un anticuerpo secundario conjugado con PE (Jackson Immunoresearch) que se dirige a la parte Fc de la proteína de ratón, y se analizó mediante citometría de flujo.

40

Dos candidatos CAR, es decir, CAR Klon 43 V3 y CAR 32716V3, se seleccionaron y clonaron en un vector de lentivirus, en el cual la expresión del CAR se acopla a la BFP (*Blue Fluorescent Protein*, proteína fluorescente azul) a través de un péptido 2A, y es impulsada por un promotor EF1a. En la **figura 9, panel superior**, se muestra una representación esquemática del vector de lentivirus. Los linfocitos T se aislaron de muestras de capa leucocitaria, se activaron con perlas de CD3/CD28 y se transdujeron 3 días después de la activación con los vectores de lentivirus, a una MOI (siglas del inglés *multiplicity of infection*, multiplicidad de infección) de 5.

50

La detección del CAR se realizó utilizando una proteína de fusión en la que el dominio extracelular de la proteína CD123 humana se fusionó con un fragmento de Fc procedente de IgG1 de ratón. La unión del CAR en la superficie celular con la parte CD123 de la proteína de fusión se detectó con un anticuerpo anti-Fc conjugado con PE y se analizó mediante citometría de flujo. La figura 9 representa el % de células que expresan CAR+ o proteína fluorescente azul (BFP+, *Blue Fluorescent Protein*) (medido mediante análisis FACS) el Día 8 o 10 después de la transducción de dos donantes diferentes.

60

Los ensayos de actividad se realizaron entre D10 y 12 después de la transducción:

La **figura 10** representa la actividad de desgranulación contra diferentes líneas celulares de células transducidas. Las células Daudi y K562 no expresan CD123, mientras que KG1a, MOLM13 y RPMI8226 expresan diferentes niveles de CD123 (KG1a<MOLM13<RPMI8226). En el panel superior se da el % de linfocitos CD107a+ (entre los

65

linfocitos CD8+) de tres donantes independientes y en el panel inferior se muestra la intensidad de la tinción de CD107a de un donante representativo. NTD significa células No Transducidas.

5 De nuevo, los datos muestran que la actividad (desgranulación figura 10 o lisis de linfocitos CD123+ figura 11) de las células que expresan CAR anti-CD123 procedentes de Klon 43 V3, es equivalente a la de 32716V3 (figura 10 y figura 11).

10 Lo que es más sorprendente, las células que expresan CAR procedentes de 32716V3 mostraron una actividad de fondo más fuerte (actividad contra células que no expresan CD123, DAUDI y K562) que las células que expresan CAR procedentes de Klon 43 V3 (figura 10 y figura 11).

15 Las células que expresan CAR procedentes de Klon 43 V3, tenían una actividad más específica y una actividad ligeramente, aunque significativamente, más alta que la de las células que expresan CAR procedentes de 32716V3 (figura 10, figura 11 y figura 12) en particular hacia células RPMI8226 que expresan el nivel más alto de CD123. (Véase la figura 13 y la figura 14)

La **figura 11** muestra la liberación de IFN gamma después de 24 horas de cultivo conjunto de linfocitos T CAR con diferentes líneas celulares.

20 La **figura 12** muestra la actividad citolítica específica de linfocitos T CAR. Los linfocitos T se cultivaron conjuntamente con células Daudi+MOLM13 o Daudi+RPMI8226 durante 4 horas. Al final del cocultivo, se determinó la viabilidad celular de cada una de las líneas celulares y se calculó un porcentaje específico de lisis celular. Los resultados representan resultados obtenidos en al menos dos donantes independientes.

25 Los resultados indican que, en los linfocitos T que expresan de manera estable el CAR, Klon43-v3 muestra una actividad ligeramente más alta que la de 32716-v3 en todos los ensayos de actividad. Además, se observó actividad de fondo en los ensayos de desgranulación y liberación de IFNgamma, cuando los linfocitos T que expresan el CAR 32716-v3 se cultivaron solos o en presencia de células que no expresaron CD123. Esto no se observó en linfocitos T que expresaban el CAR Klon43-v3. Por estos motivos, el CAR Klon43-v3 se seleccionó para realizar experimentos
30 antitumorales *in vivo* en un modelo de ratón.

35 Las **figuras 13 y 14** muestran una actividad de desgranulación de respuesta a la dosis para cada uno de los CAR utilizados. Placas de 96 pocillos se recubrieron con diferentes dosis de proteína CD123-Fc (la misma que la utilizada para la detección de linfocitos T CAR+, véase la leyenda de la figura 5), y las células se cultivaron durante 6 h en esta placa en presencia de anticuerpo CD107a fluorescente. Los resultados muestran la actividad de desgranulación (de células CD107a+ (figura 13) y la intensidad de la señal CD107a (figura 14) en células CD8+, respectivamente).

EJEMPLO 3 Modelo de ratón antitumoral

40 Como un modelo de ratón de xenoinjerto de LMA, a ratones NOG inmunodeficientes se les inyectó por vía intravenosa (iv) células MOLM13-Luciferasa. Para establecer la línea celular MOLM13-Luc, se adquirieron ratones NOG (NOD.Cg-Prkdcscidll2rgtmISug/JicTac) de 6-8 semanas de vida en Taconic (Ry, Dinamarca), células MOLM13 (DSMZ ACC 554) se transdujeron con un lentivirus que codifica la GFP y la luciferasa de luciérnaga (amsbio LVP438-PBS). Las células positivas para GFP se seleccionaron con neomicina (ref. 10131-027, Gibco, Life
45 Technologies, Saint-Aubin, Francia). Para información, la línea celular MOLM13 se ha establecido a partir de la sangre periférica de un hombre de 20 años con leucemia mieloide aguda LMA FAB M5a en la recaída en 1995 después de síndromes mielodisplásicos iniciales (SMD, anemia refractaria con exceso de blastos, AREB).

50 A los ratones se les inyectó después, por vía iv (2 o 7 días después de la inyección de la línea celular tumoral), diferentes dosis de linfocitos T CAR+ (CAR Klon43-v3) o de linfocitos T que no se transdujeron con el vector de lentivirus de CAR. Las señales bioluminiscentes se determinaron el día de la inyección de linfocitos T (DO) o en D7, 14, 21, 28 y 40 después de la inyección de linfocitos T para seguir la progresión tumoral en los diferentes animales.

55 La instalación de los animales y los procedimientos experimentales se realizaron en Oncodesign (Dijon, Francia; <http://www.oncodesign.com/>), según el Reglamento francés y europeo y la Guía NRC para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

RESULTADOS

60 La **figura 15** muestra la actividad *in vivo* de los linfocitos T que expresan el CAR de Klon43-v3.

65 A ratones inmunodeficientes se les inyectó células MOLM13-Luciferasa 2 o 7 días antes de la inyección de linfocitos T humanos no transducidos, o diferentes dosis de linfocitos T CAR+ anti-CD123. Los resultados representan la señal bioluminiscente observada en diferentes puntos de tiempo después de la inyección de linfocitos T (media de 4 ratones en cada grupo, excepto para G12, donde 1 de los 4 ratones murieron entre los días 21 y 28).

Los datos muestran que el objeto de la presente invención puede utilizarse contra células cancerosas CD123+, para el tratamiento de células de leucemia humana con cáncer CD123+.

7G3-1 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 23)

MALPVTALLPLALLLHAARP[MGWSWIFLFLVSGTGGVLSEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTF
TDYMKWVKQSHGKSLEWIGDIIPSNMGATFYNQKFKGKATLTVDRSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCTRS
HLLRASWFAYWGQGLTVTVSAASGGGGSGGGGSGGGGS[MESQTQVLMSELLFWVSGTCGDFVMTQS
PSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNSGNQKNYLTWYLQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDF
TLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPYTFGGGKLEIKR[GLAVSTISSFFPPGYQIYWAPLAGTCGVLLLSLVIT
LYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN
LGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQG
LSTATKDTYDALHMQUALPPR

5

7G3-2 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 24)

MALPVTALLPLALLLHAARP[MGWSWIFLFLVSGTGGVLSEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTF
TDYMKWVKQSHGKSLEWIGDIIPSNMGATFYNQKFKGKATLTVDRSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCTRS
HLLRASWFAYWGQGLTVTVSAASGGGGSGGGGSGGGGS[MESQTQVLMSELLFWVSGTCGDFVMTQS
PSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNSGNQKNYLTWYLQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDF
TLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPYTFGGGKLEIKR[GLAVSTISSFFPPGYQIISFFLALTSTALLFLLFFLTR
FSVVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL
NLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQ
GLSTATKDTYDALHMQUALPPR

10

7G3-3 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 25)

MALPVTALLPLALLLHAARP[MGWSWIFLFLVSGTGGVLSEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTF
TDYMKWVKQSHGKSLEWIGDIIPSNMGATFYNQKFKGKATLTVDRSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCTRS
HLLRASWFAYWGQGLTVTVSAASGGGGSGGGGSGGGGS[MESQTQVLMSELLFWVSGTCGDFVMTQS
PSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNSGNQKNYLTWYLQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDF
TLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPYTFGGGKLEIKR[TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV
HTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEG
GCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK
DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

7G3-4 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 26)

MALPVTALLPLALLLHAARP[MGWSWIFLFLVSGTGGVLSEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTF
TDYYMKWVKQSHGKSLEWIGDIIPSNQATFYNGKFKGKATLTVDSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCTRS
HLLRASWFAYWGQGLTVSAASGGGGSGGGGSGGGGS[MESQTQVLMSELLFWVSGTCGDFVMTQS
PSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNSGNQKNYLTWYLQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDF
TLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPYTFGGGKLEIKR]TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV
HTRGLDFACDIISFFLALTSTALLFLLFFLTRFSVVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE
GGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKD
KMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

7G3-5 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 27)

MALPVTALLPLALLLHAARP[MGWSWIFLFLVSGTGGVLSEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTF
TDYYMKWVKQSHGKSLEWIGDIIPSNQATFYNGKFKGKATLTVDSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCTRS
HLLRASWFAYWGQGLTVSAASGGGGSGGGGSGGGGS[MESQTQVLMSELLFWVSGTCGDFVMTQS
PSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNSGNQKNYLTWYLQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDF
TLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPYTFGGGKLEIKR]EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL
MIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKIYIWAPLAGTCGV
LLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQN
QLYNELNLRREEYDVLKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

5

7G3-6 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 28)

MALPVTALLPLALLLHAARP MGWSWIFLFLVSGTGGVLSEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTF
 TDYYMKWVKQSHGKSLEWIGDIIPSNQATFYNQKFKGKATLTVDRSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCTRS
 HLLRASWFAYWGQGLTVSAAS GGGGSGGGGSGGGGS MESQTQVLMSLLFWVSGTCGDFVMTQS
 PSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYLQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDF
 TLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPYTFGGGKLEIKR EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL
 MIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
 YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKIISFFLALTSTALLFL
 LFFLTLRFSVVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQN
 QLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
 HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Old4-3 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 29)

MALPVTALLPLALLLHAARP WTWRFVVAATGVQSQVQLLQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFST
 YAIWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGIVNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGGG
 SGPDVLDIWGQGTMTVSSAST GGGGSGGGGSGGGGS MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCVIWMTO
 SPSLLSASTGDRVTISCRMSQGIRSYLAWYQQKPGKAPELLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ
 SEDFATYYCQQYSPYTFGQGTKEIKRTV TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD
 FACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVK
 FRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA
 YSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

5

26292-1 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 30)

MALPVTALLPLALLLHAARP QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWKQRPDQGLE
 WIGRIDPYDSETHYNQKFKDKAILTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGNWDDYWGQGTTLTVSS
 GGGGSGGGGSGGGGS DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKSISKDLAWYQEKPGKTNKLLIYSGSTLQS
 GIPSRFSGSGSGTDFTLTISSELEDFAMYYCQHNKYPYTFGGGKLEIK GLAVSTISSFFPPGYQIYIWAP
 LAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPA
 YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE
 RRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

26292-2 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 31)

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWWKQRPDQGLE
WIGRIDPYDSETHYNQKFKDKAILTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGNWDDYWGQGTTLVSS
GGGGSGGGSGGGGS DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKSISKDLAWYQEKPGKTNKLLIYSGSTLQS
GIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYYCQQHNKYPYTFGGGKLEIKGLAVSTISSFFPPGYQIISFFLAL
TSTALLFLLFLLTLRFSVVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPA
YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE
RRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

26292-3 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 32)

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWWKQRPDQGLE
WIGRIDPYDSETHYNQKFKDKAILTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGNWDDYWGQGTTLVSS
GGGGSGGGSGGGGS DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKSISKDLAWYQEKPGKTNKLLIYSGSTLQS
GIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYYCQQHNKYPYTFGGGKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSL
RPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE
DGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR
KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

5

26292-4 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 33)

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWWKQRPDQGLE
WIGRIDPYDSETHYNQKFKDKAILTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGNWDDYWGQGTTLVSS
GGGGSGGGSGGGGS DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKSISKDLAWYQEKPGKTNKLLIYSGSTLQS
GIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYYCQQHNKYPYTFGGGKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSL
RPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIISFFLALTSTALLFLLFLLTLRFSVVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQ
EEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR
RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

26292-5 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 34)

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLQQGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWVKQRPDQGLE
WIGRIDPYDSETHYNQKFKDKAILTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGNWDDYWGQGTTLTVSS
GGGGSGGGSGGGGS DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKSISKDLAWYQEKP GKTNKLLIYSGSTLQS
GIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYQCQH NKYPYTFGGGKLEIK EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAG
PSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPVLDSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
KIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEEGGCELRVKFSR
SADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI
GMKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

26292-6 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 35)

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLQQGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWVKQRPDQGLE
WIGRIDPYDSETHYNQKFKDKAILTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGNWDDYWGQGTTLTVSS
GGGGSGGGSGGGGS DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKSISKDLAWYQEKP GKTNKLLIYSGSTLQS
GIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYQCQH NKYPYTFGGGKLEIK EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAG
PSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPVLDSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
KIISFFLALTSTALLFLFLTLRFSVVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEEGGCELRVKFS
RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS
EIGMKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

5

32716-1 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 36)

MALPVTALLPLALLHAARPQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYIFTNYGMNWVKQAPGKSFKWM
GWINTYTGESTYSADFKGRFAFSLETSASTAYLHINDLKNEDTATYFCARSGGYDPMDYWGQGTSTVTVSS
GGGGSGGGSGGGGS DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGNTFMHWYQQKPGQPPKLLIY
RASNLESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYYCQSNEDPPTFGAGTKLELK GLAVSTISSFFPPG
YQIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEEGGCELRVKFS
RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS
EIGMKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

32716-2 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 37)

MALPVTALLLPLALLLHAARPQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYIFTNYGMNWVKQAPGKSFKWM
GWINTYTGESTYSADFKGRFAFSLETSASTAYLHINDLKNEDTATYFCARSGGYDPM DYWGQGT SVTVSS
GGGSGGGSGGGGS DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGNTFMHWHYQQKPGQPPKLLIY
RASNLESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYYCQSNEDPPTFGAGTKLELKGLAVSTISSFFPPG
YQIISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKF
SRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY
SEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

32716-3 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 38)

MALPVTALLLPLALLLHAARPQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYIFTNYGMNWVKQAPGKSFKWM
GWINTYTGESTYSADFKGRFAFSLETSASTAYLHINDLKNEDTATYFCARSGGYDPM DYWGQGT SVTVSS
GGGSGGGSGGGGS DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGNTFMHWHYQQKPGQPPKLLIY
RASNLESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYYCQSNEDPPTFGAGTKLELKTTTPAPRPPTPAPT
IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRP
VQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE
MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPP
R

5

32716-4 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 39)

MALPVTALLLPLALLLHAARPQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYIFTNYGMNWVKQAPGKSFKWM
GWINTYTGESTYSADFKGRFAFSLETSASTAYLHINDLKNEDTATYFCARSGGYDPM DYWGQGT SVTVSS
GGGSGGGSGGGGS DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGNTFMHWHYQQKPGQPPKLLIY
RASNLESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYYCQSNEDPPTFGAGTKLELKTTTPAPRPPTPAPT
IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKLLYIFKQPFMR
PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE
MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPP
R

32716-5 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 40)

MALPVTALLLPLALLLHAARP[QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYIFTNYGMNWVKQAPGKSFKWM]
 [GWINTYTGESTYSADFKGRFAFSLETSASTAYLHINDLKNE DTATYFCARSGGYDPM DYWGQGTSVTVSS]
 GGGGSGGGGSGGGGS[DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGNTFMHWYQQKPGQPPKLLIY]
 [RASNLESGIPARFSGSRTDFTLTINPVEADDVATYYCQSNEDPPTFGAGTKLELK]EPKSPDKTHTCPPC
 PAPPVAGPSVFLFPPPKD TLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQ
 KLSLSLSPGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGC
 ELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGK P
 RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

32716-6 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 41)

MALPVTALLLPLALLLHAARP[QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYIFTNYGMNWVKQAPGKSFKWM]
 [GWINTYTGESTYSADFKGRFAFSLETSASTAYLHINDLKNE DTATYFCARSGGYDPM DYWGQGTSVTVSS]
 GGGGSGGGGSGGGGS[DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGNTFMHWYQQKPGQPPKLLIY]
 [RASNLESGIPARFSGSRTDFTLTINPVEADDVATYYCQSNEDPPTFGAGTKLELK]EPKSPDKTHTCPPC
 PAPPVAGPSVFLFPPPKD TLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQ
 KLSLSLSPGKIISFFLALTSTALLFLLFFLTRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGG
 CELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGK PRRKNPQEGLYNELQKD
 KMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

5

Klo43-1 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 42)

MALPVTALLLPLALLLHAARP[EVKLVESGGGLVQPGGSLSLSCAASGFTFTDYMSWVRQPPGKALEWL]
 [ALIRSKADGYTTEYSASVKGRFTLSRDDSQSILYLQMNALRPEDSATYYCARDAAAYSYSP EGAMDYWG]
 [QGTSVTVSS]GGGGSGGGGSGGGGS[MADYKDIVMTQSHKFMSTSVGDRVNITCKASQNVD SAVA WY]
 [QQKPGQSPKALIYSASYRSGVPDRFTGRSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQYYSTPWTFGGG TKLEIK]
 [R]GLAVSTISSFFPPGYQIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF
 PEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGK PRRKNPQEGL
 YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Klo43-2 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 43)

MALPVTALLPLALLLHAARP[EVKLVESGGGLVQPGGSLSLSCAASGFTFTDYMSWVRQPPGKALEWL]
ALIRSKADGYTTEYSASVKGRFTLSRDDSQSILYLQMNALRPEDSATYYCARDAAYSYYSPEGAMDYWG
QGTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS[MADYKDIVMTQSHKFMSTSVGDRVNITCKASQNVDSAVAWY]
QQKPGQSPKALIYSASYRYSGVPDRFTGRGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQQYYSTPWTFGGGKLEIK
RGLAVSTISSFFPPGYQIISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCR
FPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG
LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

5 **Klo43-3** (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 44)

MALPVTALLPLALLLHAARP[EVKLVESGGGLVQPGGSLSLSCAASGFTFTDYMSWVRQPPGKALEWL]
ALIRSKADGYTTEYSASVKGRFTLSRDDSQSILYLQMNALRPEDSATYYCARDAAYSYYSPEGAMDYWG
QGTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS[MADYKDIVMTQSHKFMSTSVGDRVNITCKASQNVDSAVAWY]
QQKPGQSPKALIYSASYRYSGVPDRFTGRGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQQYYSTPWTFGGGKLEIK
RTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKR
GRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE
EYDVLKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTAT
KDTYDALHMQALPPR

Klo43-4 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 45)

MALPVTALLPLALLLHAARP[EVKLVESGGGLVQPGGSLSLSCAASGFTFTDYMSWVRQPPGKALEWL]
ALIRSKADGYTTEYSASVKGRFTLSRDDSQSILYLQMNALRPEDSATYYCARDAAYSYYSPEGAMDYWG
QGTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS[MADYKDIVMTQSHKFMSTSVGDRVNITCKASQNVDSAVAWY]
QQKPGQSPKALIYSASYRYSGVPDRFTGRGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQQYYSTPWTFGGGKLEIK
RTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKR
GRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE
EYDVLKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTAT
KDTYDALHMQALPPR

10

Klo43-5 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 46)

MALPVTALLLPLALLLHAARP EVKLVESGGGLVQPGGSLSLSCAASGFTFTDYIMSWVRQPPGKALEWL
 ALIRSKADGYTTEYSASVKGRFTLSRDDSQSILYLQMNALRPEDSATYYCARDAAAYSYSPGAMDYWG
 QGTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS MADYKDIVMTQSHKFMSTSVGDRVNITCKASQNVDSAAVAY
 QQKPGQSPKALIYSASYRSGVPDRFTGRGSGTDFTLTSSVQAEDLAVYYCQQYYSTPWTFGGGKLEIK
 REPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
 HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
 DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
 SVMHEALHNYHTQKSLSLSPGKIYWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED
 GCSCRFPSEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPGEMGGKPRR
 NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

K1o43-6 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 47)

MALPVTALLLPLALLLHAARP EVKLVESGGGLVQPGGSLSLSCAASGFTFTDYIMSWVRQPPGKALEWL
 ALIRSKADGYTTEYSASVKGRFTLSRDDSQSILYLQMNALRPEDSATYYCARDAAAYSYSPGAMDYWG
 QGTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS MADYKDIVMTQSHKFMSTSVGDRVNITCKASQNVDSAAVAY
 QQKPGQSPKALIYSASYRSGVPDRFTGRGSGTDFTLTSSVQAEDLAVYYCQQYYSTPWTFGGGKLEIK
 REPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
 HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
 DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
 SVMHEALHNYHTQKSLSLSPGKIISFFLALTSTALLFLFLLRFSVVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE
 DGCSCRFPSEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPGEMGGKPRR
 KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

5

12F1-3 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 48)

MALPVTALLLPLALLLHAARP VQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTDYSITSGYYWNWIRQFPGNKLEWWMG
 YISYDGSNNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLSSVTTEDATYYCSRGEFDFDSWGQGTTLTVSSARS GG
 GSGGGGSGGGGS DIMMSQSPSSLAVSVGEKFTMTCKSSQSLFFGSTQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIY
 WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLAISSVMPEDLAVYYCQQYYNYPWTFGGGKLEIK TTPAPRPPTPA
 PTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFM
 RPVQTTQEEDGCSCRFPSEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDP
 EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALP
 PR

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 5 Arimondo, P. B., C. J. Thomas, et al. (2006). "Exploring the cellular activity of camptothecin-triple-helix-forming oligonucleotide conjugates." *Mol Cell Biol* **26**(1): 324-33.
- 10 Atkins, J. F., N. M. Wills, et al. (2007). "A case for "StopGo": reprogramming translation to augment codon meaning of GGN by promoting unconventional termination (Stop) after addition of glycine and then allowing continued translation (Go)." *Rna* **13**(6): 803-10.
- Bardenheuer, W., K. Lehmborg, et al. (2005). "Resistance to cytarabine and gemcitabine and *in vitro* selection of transduced cells after retroviral expression of cytidine deaminase in human hematopoietic progenitor cells." *Leukemia* **19**(12): 2281-8.
- 15 Betts, M. R., JM Brenchley, et al. (2003). "Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation." *J Immunol Methods* **281**(1-2): 65-78.
- 20 Bierer, B. E., G. Hollander, et al. (1993). "Cyclosporin A and FK506: molecular mechanisms of immunosuppression and probes for transplantation biology." *Curr Opin Immunol* **5**(5): 763-73.
- Boch, J., H. Scholze, et al. (2009). "Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors." *Science* **326**(5959): 1509-12.
- 25 Brewin, J., C. Mancao, et al. (2009). "Generation of EBV-specific cytotoxic T cells that are resistant to calcineurin inhibitors for the treatment of posttransplantation lymphoproliferative disease." *Blood* **114**(23): 4792-803.
- Choulika, A., A. Perrin, et al. (1995). "Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* **15**(4): 1968-73.
- 30 Christian, M., T. Cermak, et al. (2010). "Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases." *Genetics* **186**(2): 757-61.
- Cong, L., F. A. Ran, et al. (2013). "Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems." *Science* **339**(6121): 819-23.
- 35 Critchlow, S. E. Y S. P. Jackson (1998). "DNA end-joining: from yeast to man." *Trends Biochem Sci* **23**(10): 394-8.
- Dasgupta, A., D. McCarty, et al. (2011). "Engineered drug-resistant immunocompetent cells enhance tumor cell killing during a chemotherapy challenge." *Biochem Biophys Res Commun* **391**(1): 170-5.
- 40 Deltcheva, E., K. Chylinski, et al. (2011). "CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III." *Nature* **471**(7340): 602-7.
- 45 Deng, D., C. Yan, et al. (2012). "Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors." *Science* **335**(6069): 720-3.
- Donnelly, M. y G. Elliott (2001). "Nuclear localization and shuttling of herpes simplex virus tegument protein VP13/14." *J Virol* **75**(6): 2566-74.
- 50 Doronina, V. A., C. Wu, et al. (2008). "Site-specific release of nascent chains from ribosomes at a sense codon." *Mol Cell Biol* **28**(13): 4227-39.
- Eisenschmidt, K., T. Lanio, et al. (2005). "Developing a programmed restriction endonuclease for highly specific DNA cleavage." *Nucleic Acids Res* **33**(22): 7039-47.
- 55 Garneau, J. E., M. E. Dupuis, et al. (2010). "The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA." *Nature* **468**(7320): 67-71.
- 60 Gasiunas, G., R. Barrangou, et al. (2012). "Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(39): E2579-86.
- Geissler, R., H. Scholze, et al. (2011). "Transcriptional activators of human genes with programmable DNA-specificity." *PLoS One* **6**(5): e19509.
- 65 Hacke, K., J. A. Treger, et al. (2013). "Genetic modification of mouse bone marrow by lentiviral vector-mediated delivery of hypoxanthine-Guanine phosphoribosyltransferase short hairpin RNA confers chemoprotection against 6-

- thioguanine cytotoxicity." Transplant Proc **45**(5): 2040-4.
- Henderson, D. J., I. Naya, et al. (1991). "Comparison of the effects of FK-506, cyclosporin A and rapamycin on IL-2 production." Immunology **73**(3): 316-21.
- 5 Huang, P., A. Xiao, et al. (2011). "Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs." Nat Biotechnol **29**(8): 699-700.
- Jena, B., G. Dotti, et al. (2010). "Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor." Blood **116**(7): 1035-44.
- 10 Jinek, M., K. Chylinski, et al. (2012). "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity." Science **337**(6096): 816-21.
- 15 Jonnalagadda, M., C. E. Brown, et al. (2013). "Engineering human T cells for resistance to methotrexate and mycophenolate mofetil as an *in vivo* cell selection strategy." PLoS One **8**(6): e65519.
- Kalish, JM y PM Glazer (2005). "Targeted genome modification via triple helix formation." Ann N Y Acad Sci **1058**: 151-61.
- 20 Kushman, M. E., SL Kabler, et al. (2007). "Expression of human glutathione S-transferase P1 confers resistance to benzo[a]pyrene or benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol mutagenesis, macromolecularalkylation and formation of stable N2-Gua-BPDE adducts in stably transfected V79MZ cells co-expressing hCYPIA1." Carcinogenesis **28**(1): 207-14.
- 25 Li, L., MJ Piatek, et al. (2012). "Rapid and highly efficient construction of TALE-based transcriptional regulators and nucleases for genome modification." Plant Mol Biol **78**(4-5): 407-16.
- Li, T., S. Huang, et al. (2011). "TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain." Nucleic Acids Res **39**(1): 359-72.
- 30 Li, T., S. Huang, et al. (2011). "Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes." Nucleic Acids Res **39**(14): 6315-25.
- Liu, J., M. W. Albers, et al. (1992). "Inhibition of T cell signaling by immunophilin-ligand complexes correlates with loss of calcineurin phosphatase activity." Biochemistry **31**(16): 3896-901.
- 35 Ma, J. L., E. M. Kim, et al. (2003). "Yeast Mre11 and Rad1 proteins define a Ku-independent mechanism to repair double-strand breaks lacking overlapping end sequences." Mol Cell Biol **23**(23): 8820-8.
- 40 Mahfouz, M. M., L. Li, et al. (2012). "Targeted transcriptional repression using a chimeric TALE-SRDX repressor protein." Plant Mol Biol **78**(3): 311-21.
- Mahfouz, M. M., L. Li, et al. (2011). "De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(6): 2623-8.
- 45 Mak, A. N., P. Bradley, et al. (2012). "The crystal structure of TAL effector PthXol bound to its DNA target." Science **335**(6069): 716-9.
- Mali, P., L. Yang, et al. (2013). "RNA-guided human genome engineering via Cas9." Science **339**(6121): 823-6.
- 50 Miller, J. C., S. Tan, et al. (2011). "A TALE nuclease architecture for efficient genome editing." Nat Biotechnol **29**(2): 143-8.
- Morbitzer, R., P. Romer, et al. (2011). "Regulation of selected genome loci using de novo-engineered transcription activator-like effector (TALE)-type transcription factors." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(50): 21617-22.
- 55 Moscou, MJ y AJ Bogdanove (2009). "A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors." Science **326**(5959): 1501.
- Mussolino, C., R. Morbitzer, et al. (2011). "A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity." Nucleic Acids Res **39**(21): 9283-93.
- 60 Nivens, M. C., T. Felder, et al. (2004). "Engineered resistance to camptothecin and antifolates by retroviral coexpression of tyrosyl DNA phosphodiesterase-1 and thymidylate synthase." Cancer Chemother Pharmacol **53**(2): 107-15.
- 65

- Paques, F. y P. Duchateau (2007). "Meganucleases and DNA double-strand break-induced recombination: perspectives for gene therapy." Curr Gene Ther **7**(1): 49-66.
- 5 Park, T. S., SA Rosenberg, et al. (2011). "Treating cancer with genetically engineered T cells." Trends Biotechnol **29**(11): 550-7.
- Peipp, M., D. Saul, et al. (2004). "Efficient eukaryotic expression of fluorescent scFv fusion proteins directed against CD antigens for FACS applications." J Immunol Methods **285**(2): 265-80.
- 10 Perrin, A., M. Buckle, et al. (1993). "Asymmetrical recognition and activity of the I-SceI endonuclease on its site and on intron-exon junctions." Embo J **12**(7): 2939-47.
- Pingoud, A. y GH Silva (2007). "Precision genome surgery." Nat Biotechnol **25**(7): 743-4.
- 15 Porteus, MH y D. Carroll (2005). "Gene targeting using zinc finger nucleases." Nat Biotechnol **23**(8): 967-73.
- Rouet, P., F. Smih, et al. (1994). "Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease." Mol Cell Biol **14**(12): 8096-106.
- 20 Sander, J. D., L. Cade, et al. (2011). "Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs." Nat Biotechnol **29**(8): 697-8.
- Sangiolo, D., M. Lesnikova, et al. (2007). "Lentiviral vector conferring resistance to mycophenolate mofetil and sensitivity to ganciclovir for *in vivo* T-cell selection." Gene Ther **14**(21): 1549-54.
- 25 Schweitzer, B. I., A. P. Dicker, et al. (1990). "Dihydrofolate reductase as a therapeutic target." Faseb J **4**(8): 2441-52.
- Sorek, R., CM Lawrence, et al. (2013). "Sistemas inmunoadaptativos mediados por CRISPR en bacterias y arqueas". Annu Rev Biochem.
- 30 Stoddard, BL (2005). "Homing endonuclease structure and function." Q. Rev Biophys **38**(1): 49-95.
- Sugimoto, Y., S. Tsukahara, et al. (2003). "Drug-selected co-expression of P-glycoprotein and gp91 *in vivo* from an MDR1-bicistronic retrovirus vector Ha-MDR-IRES-gp91." J Gene Med **5**(5): 366-76.
- 35 Takebe, N., SC Zhao, et al. (2001). "Generation of dual resistance to 4-hydroperoxycyclophosphamide and methotrexate by retroviral transfer of the human aldehyde dehydrogenase class 1 gene and a mutated dihydrofolate reductase gene." Mol Ther **3**(1): 88-96.
- 40 Tesson, L., C. Usal, et al. (2011). "Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs." Nat Biotechnol **29**(8): 695-6.
- Weber, E., R. Gruetzner, et al. (2011). "Assembly of designer TAL effectors by Golden Gate cloning." PLoS One **6**(5): e19722.
- 45 Yam, P., M. Jensen, et al. (2006). "Ex vivo selection and expansion of cells based on expression of a mutated inosine monophosphate dehydrogenase 2 after HIV vector transduction: effects on lymphocytes, monocytes, and CD34+ stem cells." Mol Ther **14**(2): 236-44.
- 50 Zhang, F., L. Cong, et al. (2011). "Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription." Nat Biotechnol **29**(2): 149-53.
- Zielske, S. P., JS Reese, et al. (2003). "*In vivo* selection of MGMT(P140K) lentivirus-transduced human NOD/SCID repopulating cells without pretransplant irradiation conditioning." J Clin Invest **112**(10):1561-70.

55 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> CELLECTIS
- 60 <120> RECEPTORES ANTIGÉNICOS QUIMÉRICOS ESPECÍFICOS DE CD123 PARA INMUNOTERAPIA DEL CÁNCER
- <130> P81401654PCT00
- 65 <150> PA201470137
- <151> 19-03-2014

ES 2 740 903 T3

<160> 77

5 <210> 1
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> péptido señal

<400> 1

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

15 <210> 2
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

20 <220>
 <223> péptido señal

<400> 2

25 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro
 20

30 <210> 3
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> bisagra de FcgRIIIa

35 <400> 3

Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln
 1 5 10 15

40 <210> 4
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45 <220>
 <223> Fragmento del precursor de la isoforma 1 de la cadena CD8 alfa de la glucoproteína de la superficie de linfocitos T (restos 138-206)

50 <400> 4

ES 2 740 903 T3

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
35 40 45

<210> 5
<211> 231
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> bisagra de IgG1

<400> 5

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

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

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

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

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

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

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu

ES 2 740 903 T3

	100		105		110														
	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg			
			115					120					125						
	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys			
			130				135					140							
	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp			
	145					150					155					160			
	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys			
					165					170					175				
	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser			
					180				185						190				
	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser			
			195					200					205						
	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser			
			210				215					220							
	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys												
	225					230													

5 <210> 6
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> dominio transmembrana de CD8alfa
 <400> 6

Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu
1				5					10					15	

Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys
			20				

15 <210> 7
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <220>
 <223> dominio transmembrana de 41BB
 <400> 7

ES 2 740 903 T3

Ile Ile Ser Phe Phe Leu Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu
 1 5 10 15

Leu Phe Phe Leu Thr Leu Arg Phe Ser Val Val
 20 25

<210> 8
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Fragmento de 4-1BB (restos 214-255)

<400> 8

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
 1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
 20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
 35 40

<210> 9
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> fragmento de la cadena CD3 zeta de la glucoproteína de la superficie de linfocitos T

<400> 9

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
 1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
 50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
 65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 85 90 95

5

10

15

20

25

ES 2 740 903 T3

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 100 105 110

5 <210> 10
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> conector

<400> 10

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

15 <210> 11
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

20 <220>
 <223> región variable de cadena pesada 7G3

25 <400> 11

Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Val Ser Gly Thr Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

Thr Asp Tyr Tyr Met Lys Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Asp Ile Ile Pro Ser Asn Gly Ala Thr Phe Tyr Asn
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Arg Ser Ser Ser
 85 90 95

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

Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser His Leu Leu Arg Ala Ser Trp Phe Ala Tyr
 115 120 125

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

ES 2 740 903 T3

<210> 12
 <211> 134
 <212> PRT
 5 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> región variable de cadena ligera 7G3

 10 <400> 12

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Ser Leu Leu Phe Trp Val Ser
 1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asp Phe Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr
 20 25 30

Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Leu Gln
 50 55 60

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

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 85 90 95

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

Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr
 115 120 125

Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 130

<210> 13
 <211> 140
 <212> PRT
 15 <213> secuencia artificial

 <220>
 20 <223> región variable de cadena pesada Old4

 <400> 13

Trp Thr Trp Arg Phe Leu Phe Val Val Ala Ala Ala Thr Gly Val Gln

25

ES 2 740 903 T3

```

1             5             10             15

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

Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Thr
      35             40             45

Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
      50             55             60

Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ile Val Asn Tyr Ala Gln Lys
      65             70             75

Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala
      85             90             95

Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
      100            105            110

Cys Ala Arg Gly Gly Gly Ser Gly Pro Asp Val Leu Asp Ile Trp Gly
      115            120            125

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

```

<210> 14
 <211> 132
 5 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> región variable de cadena ligera Old4

10 <400> 14

```

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1             5             10             15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Val Ile Trp Met Thr Gln Ser Pro Ser Leu
      20             25             30

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

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

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

```

ES 2 740 903 T3

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

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

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

Lys Arg Thr Val
130

- 5 <210> 15
- <211> 115
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> 26292 región variable de cadena pesada
- <400> 15

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Asn Trp Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

- 15 <210> 16
- <211> 107
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial

ES 2 740 903 T3

<220>

<223> 26292 región variable de cadena ligera

5 <400> 16

```

Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Tyr Leu Ala Ala Ser Pro Gly
 1          5          10          15

Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Asp
          20          25          30

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

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50          55          60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65          70          75          80

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Lys Tyr Pro Tyr
          85          90          95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105
    
```

<210> 17

10 <211> 118

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

15 <223> 32716 región variable de cadena pesada

<400> 17

```

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

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

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Ser Phe Lys Trp Met
          35          40          45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ser Ala Asp Phe
          50          55          60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80
    
```

ES 2 740 903 T3

Leu His Ile Asn Asp Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Gly Gly Tyr Asp Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 18
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> 32716 región variable de cadena ligera

<400> 18

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
 20 25 30

Gly Asn Thr Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
 65 70 75 80

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

Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

15 <210> 19
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

20 <220>
 <223> región variable de cadena pesada Klon43

25 <400> 19

Met Ala Asp Tyr Lys Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met

ES 2 740 903 T3

```

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

```

Arg

```

5 <210> 20
  <211> 127
  <212> PRT
  <213> secuencia artificial

10 <220>
   <223> región variable de cadena ligera Klon43
   <400> 20

```

```

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

```

ES 2 740 903 T3

Tyr Cys Ala Arg Asp Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Ser Pro Glu Gly
 100 105 110

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

5 <210> 21
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> región variable de cadena pesada 12F1

<400> 21

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

Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Asp Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr
 20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp Met
 35 40 45

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

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

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

Arg Gly Glu Gly Phe Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Arg Ser
 115

15 <210> 22
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

20 <220>
 <223> región variable de cadena ligera 12F1

25 <400> 22

Asp Ile Met Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly

ES 2 740 903 T3

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

Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser His Leu Leu Arg Ala Ser Trp Phe Ala Tyr
115 120 125

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

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

Thr Gln Val Leu Met Ser Leu Leu Phe Trp Val Ser Gly Thr Cys Gly
165 170 175

Asp Phe Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
180 185 190

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
195 200 205

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
210 215 220

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
225 230 235 240

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
245 250 255

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
260 265 270

Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
275 280 285

Lys Arg Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly
290 295 300

Tyr Gln Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu
305 310 315 320

Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys
325 330 335

Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr

ES 2 740 903 T3

340	345	350
Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly		
355	360	365
Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala		
370	375	380
Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg		
385	390	395
Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu		
405	410	415
Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn		
420	425	430
Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met		
435	440	445
Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly		
450	455	460
Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala		
465	470	475
480		
Leu Pro Pro Arg		

5 <210> 24
 <211> 487
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia CAR de polipéptido 7GR-2

<400> 24

Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Val Ser Gly Thr Gly Gly															
1				5					10					15	
Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys															
20								25					30		
Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe															
35							40						45		
Thr Asp Tyr Tyr Met Lys Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu															
50						55						60			

ES 2 740 903 T3

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

ES 2 740 903 T3

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

Thr Asp Tyr Tyr Met Lys Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Asp Ile Ile Pro Ser Asn Gly Ala Thr Phe Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Arg Ser Ser Ser
85 90 95

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

Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser His Leu Leu Arg Ala Ser Trp Phe Ala Tyr
115 120 125

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

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

Thr Gln Val Leu Met Ser Leu Leu Phe Trp Val Ser Gly Thr Cys Gly
165 170 175

Asp Phe Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
180 185 190

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
195 200 205

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
210 215 220

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
225 230 235 240

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
245 250 255

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
260 265 270

Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile

ES 2 740 903 T3

275		280		285											
Lys	Arg	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr
	290					295					300				
Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala
305					310					315					320
Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile
				325					330					335	
Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser
			340					345						350	
Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr
		355					360					365			
Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu
	370					375					380				
Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu
385					390					395					400
Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln
				405					410					415	
Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu
			420					425					430		
Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly
		435					440					445			
Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln
	450					455						460			
Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu
465					470					475					480
Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr
				485					490					495	
Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro
			500					505					510		

Arg

ES 2 740 903 T3

<211> 516
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia CAR de polipéptido 7GR-4

<400> 26

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

10

ES 2 740 903 T3

210						215										220
Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val	
225					230					235					240	
Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	
				245					250					255		
Ile	Ser	Ser	Val	Gln	Ala	Glu	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Asn	
			260					265					270			
Asp	Tyr	Ser	Tyr	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	
		275					280					285				
Lys	Arg	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	
	290					295					300					
Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	
305					310					315					320	
Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	
				325					330					335		
Ile	Ser	Phe	Phe	Leu	Ala	Leu	Thr	Ser	Thr	Ala	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	
			340					345					350			
Phe	Phe	Leu	Thr	Leu	Arg	Phe	Ser	Val	Val	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	
		355					360					365				
Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	
	370					375					380					
Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	
385					390					395					400	
Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	
				405					410					415		
Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	
			420					425					430			
Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	
		435					440					445				
Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	
	450					455					460					

ES 2 740 903 T3

Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
465 470 475 480

Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
485 490 495

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

Leu Pro Pro Arg
515

5 <210> 27
<211> 699
<212> PRT
<213> secuencia artificial

10 <220>
<223> Secuencia CAR de polipéptido 7GR-5

<400> 27

Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Val Ser Gly Thr Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Thr Asp Tyr Tyr Met Lys Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Asp Ile Ile Pro Ser Asn Gly Ala Thr Phe Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Arg Ser Ser Ser
85 90 95

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

Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser His Leu Leu Arg Ala Ser Trp Phe Ala Tyr
115 120 125

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

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Glu Ser Gln

15

ES 2 740 903 T3

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 405 410 415

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 420 425 430

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 450 455 460

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 465 470 475 480

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 485 490 495

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 500 505 510

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu
 515 520 525

Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr
 530 535 540

Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe
 545 550 555 560

Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg
 565 570 575

Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser
 580 585 590

Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
 595 600 605

Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
 610 615 620

Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
 625 630 635 640

Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
 645 650 655

ES 2 740 903 T3

Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
660 665 670

His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
675 680 685

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
690 695

<210> 28

<211> 702

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia CAR de polipéptido 7GR-6

<400> 28

Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Val Ser Gly Thr Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Thr Asp Tyr Tyr Met Lys Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Asp Ile Ile Pro Ser Asn Gly Ala Thr Phe Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Arg Ser Ser Ser
85 90 95

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

Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser His Leu Leu Arg Ala Ser Trp Phe Ala Tyr
115 120 125

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

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

ES 2 740 903 T3

Thr Gln Val Leu Met Ser Leu Leu Phe Trp Val Ser Gly Thr Cys Gly
165 170 175

Asp Phe Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
180 185 190

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
195 200 205

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
210 215 220

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
225 230 235 240

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
245 250 255

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
260 265 270

Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
275 280 285

Lys Arg Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
290 295 300

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
305 310 315 320

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
325 330 335

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
340 345 350

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
355 360 365

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
370 375 380

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
385 390 395 400

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
405 410 415

ES 2 740 903 T3

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 420 425 430

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 450 455 460

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 465 470 475 480

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 485 490 495

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 500 505 510

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ile Ile Ser Phe Phe Leu Ala
 515 520 525

Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu Arg
 530 535 540

Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys
 545 550 555 560

Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys
 565 570 575

Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val
 580 585 590

Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn
 595 600 605

Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
 610 615 620

Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg
 625 630 635 640

Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
 645 650 655

Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
 660 665 670

ES 2 740 903 T3

Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys
 675 680 685

Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 690 695 700

<210> 29
 <211> 510
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de CAR de polipéptido Old4-3

<400> 29

Trp Thr Trp Arg Phe Leu Phe Val Val Ala Ala Ala Thr Gly Val Gln
 1 5 10 15

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

Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Thr
 35 40 45

Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 50 55 60

Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ile Val Asn Tyr Ala Gln Lys
 65 70 75 80

Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala
 85 90 95

Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 100 105 110

Cys Ala Arg Gly Gly Gly Ser Gly Pro Asp Val Leu Asp Ile Trp Gly
 115 120 125

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

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Asp Met Arg Val
 145 150 155 160

Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro Gly Ala Arg
 165 170 175

ES 2 740 903 T3

Cys Val Ile Trp Met Thr Gln Ser Pro Ser Leu Leu Ser Ala Ser Thr
 180 185 190

Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Met Ser Gln Gly Ile Arg Ser
 195 200 205

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu
 210 215 220

Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 225 230 235 240

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 245 250 255

Ser Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Phe Pro
 260 265 270

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Thr
 275 280 285

Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser
 290 295 300

Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly
 305 310 315 320

Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp
 325 330 335

Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile
 340 345 350

Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys
 355 360 365

Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys
 370 375 380

Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val
 385 390 395 400

Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn
 405 410 415

Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
 420 425 430

ES 2 740 903 T3

Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg
 435 440 445

Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
 450 455 460

Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
 465 470 475 480

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

Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 500 505 510

5 <210> 30
 <211> 431
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> secuencia CAR de polipéptido 26292-1

<400> 30

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

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

Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Asn Trp Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125

ES 2 740 903 T3

Gly Ser Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Tyr Leu Ala Ala Ser
130 135 140

Pro Gly Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser
145 150 155

Lys Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu
165 170 175

Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe
180 185 190

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
195 200 205

Glu Pro Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Lys Tyr
210 215 220

Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Leu Ala
225 230 235 240

Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln Ile Tyr Ile
245 250 255

Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val
260 265 270

Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
275 280 285

Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly
290 295 300

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg
305 310 315 320

Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln
325 330 335

Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp
340 345 350

Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro
355 360 365

Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp
370 375 380

ES 2 740 903 T3

Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg
 385 390 395 400

Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr
 405 410 415

Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 420 425 430

<210> 31
 <211> 434
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia CAR de polipéptido 26292-2

<400> 31

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

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

Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Asn Trp Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125

Gly Ser Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Tyr Leu Ala Ala Ser
 130 135 140

Pro Gly Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser
 145 150 155 160

ES 2 740 903 T3

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

ES 2 740 903 T3

Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro
 420 425 430

Pro Arg

<210> 32
 <211> 460
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia CAR de polipéptido 26292-3

<400> 32

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

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

Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Asn Trp Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125

Gly Ser Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Tyr Leu Ala Ala Ser
 130 135 140

Pro Gly Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser
 145 150 155 160

Lys Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu
 165 170 175

ES 2 740 903 T3

Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe
 180 185 190

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 195 200 205

Glu Pro Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Lys Tyr
 210 215 220

Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Thr Thr Thr
 225 230 235 240

Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro
 245 250 255

Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val
 260 265 270

His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro
 275 280 285

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

Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro
 305 310 315 320

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 740 903 T3

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

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

<210> 33
 <211> 463
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia CAR de polipéptido 26292-4

<400> 33

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

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

Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Asn Trp Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125

Gly Ser Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Tyr Leu Ala Ala Ser
 130 135 140

Pro Gly Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser
 145 150 155 160

Lys Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu
 165 170 175

ES 2 740 903 T3

Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe
 180 185 190
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 195 200 205
 Glu Pro Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Lys Tyr
 210 215 220
 Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Thr Thr Thr
 225 230 235 240
 Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro
 245 250 255
 Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val
 260 265 270
 His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Ile Ser Phe Phe Leu
 275 280 285
 Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu
 290 295 300
 Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
 305 310 315 320
 Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly
 325 330 335
 Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg
 340 345 350
 Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln
 355 360 365
 Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp
 370 375 380
 Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro
 385 390 395 400
 Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp
 405 410 415
 Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg
 420 425 430

ES 2 740 903 T3

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

Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 450 455 460

<210> 34
 <211> 646
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia CAR de polipéptido 26292-5

<400> 34

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

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

Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Asn Trp Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125

Gly Ser Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Tyr Leu Ala Ala Ser
 130 135 140

Pro Gly Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser
 145 150 155 160

Lys Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu
 165 170 175

ES 2 740 903 T3

Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe
 180 185 190
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 195 200 205
 Glu Pro Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Lys Tyr
 210 215 220
 Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Pro Lys
 225 230 235 240
 Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
 245 250 255
 Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 260 265 270
 Met Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 275 280 285
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 290 295 300
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 305 310 315 320
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 325 330 335
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 340 345 350
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 355 360 365
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 370 375 380
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 385 390 395 400
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 405 410 415
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 420 425 430

ES 2 740 903 T3

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 450 455 460

Ser Pro Gly Lys Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly
 465 470 475 480

Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg
 485 490 495

Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln
 500 505 510

Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu
 515 520 525

Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala
 530 535 540

Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
 545 550 555 560

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

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

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

Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
 610 615 620

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

Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 645

<210> 35
 <211> 649
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia CAR de polipéptido 26292-6

5

10

ES 2 740 903 T3

<400> 35

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Asn Trp Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Tyr Leu Ala Ala Ser
130 135 140

Pro Gly Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser
145 150 155 160

Lys Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu
165 170 175

Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe
180 185 190

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
195 200 205

Glu Pro Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Lys Tyr
210 215 220

Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Pro Lys
225 230 235 240

ES 2 740 903 T3

Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
 245 250 255

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 260 265 270

Met Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 275 280 285

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 290 295 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 305 310 315 320

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 325 330 335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 355 360 365

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 370 375 380

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 405 410 415

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 450 455 460

Ser Pro Gly Lys Ile Ile Ser Phe Phe Leu Ala Leu Thr Ser Thr Ala
 465 470 475 480

Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu Arg Phe Ser Val Val Lys

ES 2 740 903 T3

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ser Ala Asp Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu His Ile Asn Asp Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Gly Gly Tyr Asp Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

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

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu
 130 135 140

Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu
 145 150 155 160

Ser Val Asp Asn Tyr Gly Asn Thr Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys
 165 170 175

Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu
 180 185 190

Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe
 195 200 205

Thr Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr
 210 215 220

Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
 225 230 235 240

Leu Glu Leu Lys Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro
 245 250 255

Pro Gly Tyr Gln Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly
 260 265 270

Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg
 275 280 285

Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln

ES 2 740 903 T3

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

ES 2 740 903 T3

				325						330						335
Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	
			340					345					350			
Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	
		355					360					365				
Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	
	370					375					380					
Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	
385					390					395					400	
Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	
				405					410					415		
Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	
			420					425					430			
Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	
		435					440					445				
Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	
	450					455					460					
Pro	Pro	Arg														
	465															

<210> 39
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia CAR de polipéptido 32716-4

<400> 39

Gln	Ile	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu
1				5					10					15	
Thr	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ile	Phe	Thr	Asn	Tyr
			20					25					30		
Gly	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Ser	Phe	Lys	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ser	Thr	Tyr	Ser	Ala	Asp	Phe
	50					55					60				

ES 2 740 903 T3

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

ES 2 740 903 T3

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ser Ala Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu His Ile Asn Asp Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Gly Gly Tyr Asp Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu
130 135 140

Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu
145 150 155 160

Ser Val Asp Asn Tyr Gly Asn Thr Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys
165 170 175

Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu
180 185 190

Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe
195 200 205

Thr Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220

Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
225 230 235 240

Leu Glu Leu Lys Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
245 250 255

Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
260 265 270

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr
275 280 285

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn

ES 2 740 903 T3

290						295										300
Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	
305					310					315					320	
Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	
				325					330					335		
Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	
			340					345					350			
Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	
		355					360					365				
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	
	370					375					380					
Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	
385					390					395					400	
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	
				405					410					415		
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	
			420					425					430			
Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	
		435					440					445				
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	
	450					455					460					
Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	
465					470					475					480	
Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	
				485					490					495		
Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	
			500					505					510			
Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	
		515					520					525				
Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	
	530					535					540					

ES 2 740 903 T3

Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln
545 550 555 560

Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
565 570 575

Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg
580 585 590

Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met
595 600 605

Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly
610 615 620

Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp
625 630 635 640

Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
645 650

<210> 41

<211> 656

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> secuencia CAR de polipéptido 32716-6

<400> 41

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

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

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Ser Phe Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ser Ala Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu His Ile Asn Asp Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Gly Gly Tyr Asp Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

5

10

ES 2 740 903 T3

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

ES 2 740 903 T3

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
610 615 620

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
625 630 635 640

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
645 650 655

<210> 42
<211> 449
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de CAR de polipéptido Klo43-1

<400> 42

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

Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Ala Leu Ile Arg Ser Lys Ala Asp Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Ser Pro Glu Gly
100 105 110

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Ala
130 135 140

ES 2 740 903 T3

Asp Tyr Lys Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr
 145 150 155 160

Ser Val Gly Asp Arg Val Asn Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val
 165 170 175

Asp Ser Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys
 180 185 190

Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg
 195 200 205

Phe Thr Gly Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
 210 215 220

Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser
 225 230 235 240

Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly
 245 250 255

Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln Ile
 260 265 270

Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser
 275 280 285

Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr
 290 295 300

Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu
 305 310 315 320

Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu
 325 330 335

Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln
 340 345 350

Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu
 355 360 365

Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly
 370 375 380

Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
 385 390 395 400

ES 2 740 903 T3

Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
 405 410 415

Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr
 420 425 430

Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
 435 440 445

Arg

<210> 43
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de CAR de polipéptido K1043-2

<400> 43

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

Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Ala Leu Ile Arg Ser Lys Ala Asp Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Ser Pro Glu Gly
 100 105 110

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly
 115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Ala
 130 135 140

ES 2 740 903 T3

Asp Tyr Lys Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr
 145 150 155 160

Ser Val Gly Asp Arg Val Asn Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val
 165 170 175

Asp Ser Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys
 180 185 190

Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg
 195 200 205

Phe Thr Gly Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
 210 215 220

Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser
 225 230 235 240

Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly
 245 250 255

Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln Ile
 260 265 270

Ile Ser Phe Phe Leu Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu
 275 280 285

Phe Phe Leu Thr Leu Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys
 290 295 300

Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr
 305 310 315 320

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

Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala
 340 345 350

Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg
 355 360 365

Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu
 370 375 380

Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn
 385 390 395 400

ES 2 740 903 T3

Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
 405 410 415

Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
 420 425 430

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

Leu Pro Pro Arg
 450

<210> 44

<211> 478

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> secuencia de CAR de polipéptido Klo43-3

<400> 44

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

Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Ala Leu Ile Arg Ser Lys Ala Asp Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Ser Pro Glu Gly
 100 105 110

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly
 115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Ala
 130 135 140

ES 2 740 903 T3

Asp Tyr Lys Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr
 145 150 155 160
 Ser Val Gly Asp Arg Val Asn Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val
 165 170 175
 Asp Ser Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys
 180 185 190
 Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg
 195 200 205
 Phe Thr Gly Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
 210 215 220
 Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser
 225 230 235 240
 Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 245 250 255
 Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser
 260 265 270
 Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly
 275 280 285
 Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp
 290 295 300
 Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile
 305 310 315 320
 Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys
 325 330 335
 Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys
 340 345 350
 Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val
 355 360 365
 Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn
 370 375 380
 Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
 385 390 395 400

ES 2 740 903 T3

Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg
 405 410 415

Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
 420 425 430

Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
 435 440 445

Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys
 450 455 460

Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 465 470 475

5 <210> 45
 <211> 481
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> secuencia de CAR de polipéptido Klo43-4

<400> 45

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

Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Ala Leu Ile Arg Ser Lys Ala Asp Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Ser Pro Glu Gly
 100 105 110

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly
 115 120 125

15

ES 2 740 903 T3

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Ala
 130 135 140

Asp Tyr Lys Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr
 145 150 155 160

Ser Val Gly Asp Arg Val Asn Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val
 165 170 175

Asp Ser Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys
 180 185 190

Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg
 195 200 205

Phe Thr Gly Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
 210 215 220

Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser
 225 230 235 240

Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 245 250 255

Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser
 260 265 270

Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly
 275 280 285

Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Ile Ser Phe
 290 295 300

Phe Leu Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu
 305 310 315 320

Thr Leu Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr
 325 330 335

Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu
 340 345 350

Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu
 355 360 365

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

ES 2 740 903 T3

Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu
385 390 395 400

Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly
405 410 415

Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
420 425 430

Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
435 440 445

Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr
450 455 460

Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
465 470 475 480

Arg

<210> 46
<211> 664
5 <212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
10 <223> secuencia de CAR de polipéptido Klo43-5

<400> 46

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

Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Ala Leu Ile Arg Ser Lys Ala Asp Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala
50 55 60

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

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

ES 2 740 903 T3

Tyr Cys Ala Arg Asp Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Ser Pro Glu Gly
 100 105 110

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly
 115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Ala
 130 135 140

Asp Tyr Lys Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr
 145 150 155 160

Ser Val Gly Asp Arg Val Asn Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val
 165 170 175

Asp Ser Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys
 180 185 190

Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg
 195 200 205

Phe Thr Gly Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
 210 215 220

Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser
 225 230 235 240

Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Glu
 245 250 255

Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 260 265 270

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 275 280 285

Thr Leu Met Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 290 295 300

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 305 310 315 320

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 325 330 335

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 340 345 350

ES 2 740 903 T3

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

ES 2 740 903 T3

Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser
 610 615 620

Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
 625 630 635 640

Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu
 645 650 655

His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 660

<210> 47
 <211> 667
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de CAR de polipéptido Klo43-6

<400> 47

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

Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Ala Leu Ile Arg Ser Lys Ala Asp Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Ser Pro Glu Gly
 100 105 110

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly
 115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Ala
 130 135 140

ES 2 740 903 T3

Asp Tyr Lys Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr
 145 150 155 160
 Ser Val Gly Asp Arg Val Asn Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val
 165 170 175
 Asp Ser Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys
 180 185 190
 Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg
 195 200 205
 Phe Thr Gly Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
 210 215 220
 Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser
 225 230 235 240
 Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Glu
 245 250 255
 Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 260 265 270
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 275 280 285
 Thr Leu Met Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 290 295 300
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 305 310 315 320
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 325 330 335
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 340 345 350
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 355 360 365
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 370 375 380
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 385 390 395 400

ES 2 740 903 T3

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 405 410 415

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 420 425 430

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 435 440 445

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 450 455 460

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 465 470 475 480

Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ile Ile Ser Phe Phe Leu Ala Leu Thr Ser
 485 490 495

Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu Arg Phe Ser Val
 500 505 510

Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe
 515 520 525

Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg
 530 535 540

Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser
 545 550 555 560

Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
 565 570 575

Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
 580 585 590

Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
 595 600 605

Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
 610 615 620

Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
 625 630 635 640

His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr

ES 2 740 903 T3

645

650

655

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
660 665

<210> 48
<211> 470
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia CAR de polipéptido 12F1-3

<400> 48

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

Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Asp Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

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

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

Arg Gly Glu Gly Phe Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Arg Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Met Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser
130 135 140

Leu Ala Val Ser Val Gly Glu Lys Phe Thr Met Thr Cys Lys Ser Ser
145 150 155 160

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

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

ES 2 740 903 T3

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

Thr Asp Phe Thr Leu Ala Ile Ser Ser Val Met Pro Glu Asp Leu Ala
 210 215 220

Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly
 225 230 235 240

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro
 245 250 255

Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu
 260 265 270

Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp
 275 280 285

Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly
 290 295 300

Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg
 305 310 315 320

Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln
 325 330 335

Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu
 340 345 350

Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala
 355 360 365

Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
 370 375 380

Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp
 385 390 395 400

Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu
 405 410 415

Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile
 420 425 430

Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr

ES 2 740 903 T3

435

440

445

Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
 450 455 460

Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 465 470

5

<210> 49
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> NTALE diana TRAC_T0
 <400> 49

Thr Thr Gly Thr Cys Cys Cys Ala Cys Ala Gly Ala Thr Ala Thr Cys
 1 5 10 15

Cys Ala Gly Ala Ala Cys Cys Cys Thr Gly Ala Cys Cys Cys Thr Gly
 20 25 30

Cys Cys Gly Thr Gly Thr Ala Cys Cys Ala Gly Cys Thr Gly Ala Gly
 35 40 45

Ala

15

<210> 50
 <211> 530
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> dominio de unión a TAL TRAC_T01-L
 <400> 50

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

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
 20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly
 35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 50 55 60

25

ES 2 740 903 T3

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
65 70 75 80

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
100 105 110

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
130 135 140

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210 215 220

Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225 230 235 240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260 265 270

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly
305 310 315 320

ES 2 740 903 T3

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
 340 345 350

Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val
 355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
 370 375 380

Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
 385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
 405 410 415

Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala
 420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
 435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
 465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala
 515 520 525

Leu Glu
 530

- 5 <210> 51
- <211> 530
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>

ES 2 740 903 T3

<223> dominio de unión a TAL TRAC_T01-R

<400> 51

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
 1 5 10 15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
 20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
 35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
 65 70 75 80

Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
 85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
 100 105 110

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

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
 130 135 140

Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
 145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
 165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
 195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 225 230 235 240

ES 2 740 903 T3

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala
 245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
 260 265 270

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
 275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
 290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
 305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
 340 345 350

Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val
 355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
 370 375 380

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
 385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
 405 410 415

Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala
 420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
 435 440 445

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

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
 465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 485 490 495

ES 2 740 903 T3

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala
 515 520 525

Leu Glu
 530

5 <210> 52
 <211> 2814
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> polinucleótido que codifica NTALE TRAC_T01-L

<400> 52

Ala Thr Gly Gly Gly Cys Gly Ala Thr Cys Cys Thr Ala Ala Ala Ala
 1 5 10 15

Ala Gly Ala Ala Ala Cys Gly Thr Ala Ala Gly Gly Thr Cys Ala Thr
 20 25 30

Cys Gly Ala Thr Thr Ala Cys Cys Cys Ala Thr Ala Cys Gly Ala Thr
 35 40 45

Gly Thr Thr Cys Cys Ala Gly Ala Thr Thr Ala Cys Gly Cys Thr Ala
 50 55 60

Thr Cys Gly Ala Thr Ala Thr Cys Gly Cys Cys Gly Ala Thr Cys Thr
 65 70 75 80

Ala Cys Gly Cys Ala Cys Gly Cys Thr Cys Gly Gly Cys Thr Ala Cys
 85 90 95

Ala Gly Cys Cys Ala Gly Cys Ala Gly Cys Ala Ala Cys Ala Gly Gly
 100 105 110

Ala Gly Ala Ala Gly Ala Thr Cys Ala Ala Ala Cys Cys Gly Ala Ala
 115 120 125

Gly Gly Thr Thr Cys Gly Thr Thr Cys Gly Ala Cys Ala Gly Thr Gly
 130 135 140

Gly Cys Gly Cys Ala Gly Cys Ala Cys Cys Ala Cys Gly Ala Gly Gly
 145 150 155 160

15

ES 2 740 903 T3

Cys Ala Cys Thr Gly Gly Thr Cys Gly Gly Cys Cys Ala Cys Gly Gly
 165 170 175
 Gly Thr Thr Thr Ala Cys Ala Cys Ala Cys Gly Cys Gly Cys Ala Cys
 180 185 190
 Ala Thr Cys Gly Thr Thr Gly Cys Gly Thr Thr Ala Ala Gly Cys Cys
 195 200 205
 Ala Ala Cys Ala Cys Cys Cys Gly Gly Cys Ala Gly Cys Gly Thr Thr
 210 215 220
 Ala Gly Gly Gly Ala Cys Cys Gly Thr Cys Gly Cys Thr Gly Thr Cys
 225 230 235 240
 Ala Ala Gly Thr Ala Thr Cys Ala Gly Gly Ala Cys Ala Thr Gly Ala
 245 250 255
 Thr Cys Gly Cys Ala Gly Cys Gly Thr Thr Gly Cys Cys Ala Gly Ala
 260 265 270
 Gly Gly Cys Gly Ala Cys Ala Cys Ala Cys Gly Ala Ala Gly Cys Gly
 275 280 285
 Ala Thr Cys Gly Thr Thr Gly Gly Cys Gly Thr Cys Gly Gly Cys Ala
 290 295 300
 Ala Ala Cys Ala Gly Thr Gly Gly Thr Cys Cys Gly Gly Cys Gly Cys
 305 310 315 320
 Ala Cys Gly Cys Gly Cys Thr Cys Thr Gly Gly Ala Gly Gly Cys Cys
 325 330 335
 Thr Thr Gly Cys Thr Cys Ala Cys Gly Gly Thr Gly Gly Cys Gly Gly
 340 345 350
 Gly Ala Gly Ala Gly Thr Thr Gly Ala Gly Ala Gly Gly Thr Cys Cys
 355 360 365
 Ala Cys Cys Gly Thr Thr Ala Cys Ala Gly Thr Thr Gly Gly Ala Cys
 370 375 380
 Ala Cys Ala Gly Gly Cys Cys Ala Ala Cys Thr Thr Cys Thr Cys Ala
 385 390 395 400
 Ala Gly Ala Thr Thr Gly Cys Ala Ala Ala Ala Cys Gly Thr Gly Gly
 405 410 415

ES 2 740 903 T3

Cys Gly Gly Cys Gly Thr Gly Ala Cys Cys Gly Cys Ala Gly Thr Gly
 420 425 430
 Gly Ala Gly Gly Cys Ala Gly Thr Gly Cys Ala Thr Gly Cys Ala Thr
 435 440 445
 Gly Gly Cys Gly Cys Ala Ala Thr Gly Cys Ala Cys Thr Gly Ala Cys
 450 455 460
 Gly Gly Gly Thr Gly Cys Cys Cys Cys Gly Cys Thr Cys Ala Ala Cys
 465 470 475 480
 Thr Thr Gly Ala Cys Cys Cys Cys Cys Cys Ala Gly Cys Ala Gly Gly
 485 490 495
 Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys Cys Ala Thr Cys Gly Cys Cys Ala Gly
 500 505 510
 Cys Ala Ala Thr Gly Gly Cys Gly Gly Thr Gly Gly Cys Ala Ala Gly
 515 520 525
 Cys Ala Gly Gly Cys Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly Ala Cys Gly Gly
 530 535 540
 Thr Cys Cys Ala Gly Cys Gly Gly Cys Thr Gly Thr Thr Gly Cys Cys
 545 550 555 560
 Gly Gly Thr Gly Cys Thr Gly Thr Gly Cys Cys Ala Gly Gly Cys Cys
 565 570 575
 Cys Ala Cys Gly Gly Cys Thr Thr Gly Ala Cys Cys Cys Cys Cys Cys
 580 585 590
 Ala Gly Cys Ala Gly Gly Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys Cys Ala Thr
 595 600 605
 Cys Gly Cys Cys Ala Gly Cys Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Thr
 610 615 620
 Gly Gly Cys Ala Ala Gly Cys Ala Gly Gly Cys Gly Cys Thr Gly Gly
 625 630 635 640
 Ala Gly Ala Cys Gly Gly Thr Cys Cys Ala Gly Cys Gly Gly Cys Thr
 645 650 655
 Gly Thr Thr Gly Cys Cys Gly Gly Thr Gly Cys Thr Gly Thr Gly Cys

ES 2 740 903 T3

Ala Thr Cys Gly Cys Cys Ala Gly Cys Cys Ala Cys Gly Ala Thr Gly
 915 920 925

Gly Cys Gly Gly Cys Ala Ala Gly Cys Ala Gly Gly Cys Gly Cys Thr
 930 935 940

Gly Gly Ala Gly Ala Cys Gly Gly Thr Cys Cys Ala Gly Cys Gly Gly
 945 950 955 960

Cys Thr Gly Thr Thr Gly Cys Cys Gly Gly Thr Gly Cys Thr Gly Thr
 965 970 975

Gly Cys Cys Ala Gly Gly Cys Cys Cys Ala Cys Gly Gly Cys Thr Thr
 980 985 990

Gly Ala Cys Cys Cys Cys Gly Gly Ala Gly Cys Ala Gly Gly Thr Gly
 995 1000 1005

Gly Thr Gly Gly Cys Cys Ala Thr Cys Gly Cys Cys Ala Gly Cys Cys
 1010 1015 1020

Ala Cys Gly Ala Thr Gly Gly Cys Gly Gly Cys Ala Ala Gly Cys Ala
 1025 1030 1035 1040

Gly Gly Cys Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly Ala Cys Gly Gly Thr Cys
 1045 1050 1055

Cys Ala Gly Cys Gly Gly Cys Thr Gly Thr Thr Gly Cys Cys Gly Gly
 1060 1065 1070

Thr Gly Cys Thr Gly Thr Gly Cys Cys Ala Gly Gly Cys Cys Cys Ala
 1075 1080 1085

Cys Gly Gly Cys Thr Thr Gly Ala Cys Cys Cys Gly Gly Ala Gly
 1090 1095 1100

Cys Ala Gly Gly Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys Cys Ala Thr Cys Gly
 1105 1110 1115 1120

Cys Cys Ala Gly Cys Ala Ala Thr Ala Thr Thr Gly Gly Thr Gly Gly
 1125 1130 1135

Cys Ala Ala Gly Cys Ala Gly Gly Cys Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly
 1140 1145 1150

Ala Cys Gly Gly Thr Gly Cys Ala Gly Gly Cys Gly Cys Thr Gly Thr
 1155 1160 1165

ES 2 740 903 T3

Thr Gly Cys Cys Gly Gly Thr Gly Cys Thr Gly Thr Gly Cys Cys Ala
 1170 1175 1180

Gly Gly Cys Cys Cys Ala Cys Gly Gly Cys Thr Thr Gly Ala Cys Cys
 1185 1190 1195 1200

Cys Cys Gly Gly Ala Gly Cys Ala Gly Gly Thr Gly Gly Thr Gly Gly
 1205 1210 1215

Cys Cys Ala Thr Cys Gly Cys Cys Ala Gly Cys Cys Ala Cys Gly Ala
 1220 1225 1230

Thr Gly Gly Cys Gly Gly Cys Ala Ala Gly Cys Ala Gly Gly Cys Gly
 1235 1240 1245

Cys Thr Gly Gly Ala Gly Ala Cys Gly Gly Thr Cys Cys Ala Gly Cys
 1250 1255 1260

Gly Gly Cys Thr Gly Thr Thr Gly Cys Cys Gly Gly Thr Gly Cys Thr
 1265 1270 1275 1280

Gly Thr Gly Cys Cys Ala Gly Gly Cys Cys Cys Ala Cys Gly Gly Cys
 1285 1290 1295

Thr Thr Gly Ala Cys Cys Cys Cys Gly Gly Ala Gly Cys Ala Gly Gly
 1300 1305 1310

Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys Cys Ala Thr Cys Gly Cys Cys Ala Gly
 1315 1320 1325

Cys Ala Ala Thr Ala Thr Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys Ala Ala Gly
 1330 1335 1340

Cys Ala Gly Gly Cys Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly Ala Cys Gly Gly
 1345 1350 1355 1360

Thr Gly Cys Ala Gly Gly Cys Gly Cys Thr Gly Thr Thr Gly Cys Cys
 1365 1370 1375

Gly Gly Thr Gly Cys Thr Gly Thr Gly Cys Cys Ala Gly Gly Cys Cys
 1380 1385 1390

Cys Ala Cys Gly Gly Cys Thr Thr Gly Ala Cys Cys Cys Cys Cys Cys
 1395 1400 1405

Ala Gly Cys Ala Gly Gly Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys Cys Ala Thr
 1410 1415 1420

ES 2 740 903 T3

Cys Gly Cys Cys Ala Gly Cys Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Thr
 1425 1430 1435 1440

Gly Gly Cys Ala Ala Gly Cys Ala Gly Gly Cys Gly Cys Thr Gly Gly
 1445 1450 1455

Ala Gly Ala Cys Gly Gly Thr Cys Cys Ala Gly Cys Gly Gly Cys Thr
 1460 1465 1470

Gly Thr Thr Gly Cys Cys Gly Gly Thr Gly Cys Thr Gly Thr Gly Cys
 1475 1480 1485

Cys Ala Gly Gly Cys Cys Cys Ala Cys Gly Gly Cys Thr Thr Gly Ala
 1490 1495 1500

Cys Cys Cys Cys Gly Gly Ala Gly Cys Ala Gly Gly Thr Gly Gly Thr
 1505 1510 1515 1520

Gly Gly Cys Cys Ala Thr Cys Gly Cys Cys Ala Gly Cys Ala Ala Thr
 1525 1530 1535

Ala Thr Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys Ala Ala Gly Cys Ala Gly Gly
 1540 1545 1550

Cys Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly Ala Cys Gly Gly Thr Gly Cys Ala
 1555 1560 1565

Gly Gly Cys Gly Cys Thr Gly Thr Thr Gly Cys Cys Gly Gly Thr Gly
 1570 1575 1580

Cys Thr Gly Thr Gly Cys Cys Ala Gly Gly Cys Cys Cys Ala Cys Gly
 1585 1590 1595 1600

Gly Cys Thr Thr Gly Ala Cys Cys Cys Cys Cys Cys Ala Gly Cys Ala
 1605 1610 1615

Gly Gly Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys Cys Ala Thr Cys Gly Cys Cys
 1620 1625 1630

Ala Gly Cys Ala Ala Thr Gly Gly Cys Gly Gly Thr Gly Gly Cys Ala
 1635 1640 1645

Ala Gly Cys Ala Gly Gly Cys Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly Ala Cys
 1650 1655 1660

Gly Gly Thr Cys Cys Ala Gly Cys Gly Gly Cys Thr Gly Thr Thr Gly

ES 2 740 903 T3

1665		1670		1675		1680
Cys Cys Gly Gly Thr Gly Cys Thr Gly Thr Gly Cys Cys Ala Gly Gly		1685		1690		1695
Cys Cys Cys Ala Cys Gly Gly Cys Thr Thr Gly Ala Cys Cys Cys Cys		1700		1705		1710
Gly Gly Ala Gly Cys Ala Gly Gly Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys Cys		1715		1720		1725
Ala Thr Cys Gly Cys Cys Ala Gly Cys Ala Ala Thr Ala Thr Thr Gly		1730		1735		1740
Gly Thr Gly Gly Cys Ala Ala Gly Cys Ala Gly Gly Cys Gly Cys Thr		1745		1750		1755
Gly Gly Ala Gly Ala Cys Gly Gly Thr Gly Cys Ala Gly Gly Cys Gly		1765		1770		1775
Cys Thr Gly Thr Thr Gly Cys Cys Gly Gly Thr Gly Cys Thr Gly Thr		1780		1785		1790
Gly Cys Cys Ala Gly Gly Cys Cys Cys Ala Cys Gly Gly Cys Thr Thr		1795		1800		1805
Gly Ala Cys Cys Cys Cys Cys Cys Ala Gly Cys Ala Gly Gly Thr Gly		1810		1815		1820
Gly Thr Gly Gly Cys Cys Ala Thr Cys Gly Cys Cys Ala Gly Cys Ala		1825		1830		1835
Ala Thr Gly Gly Cys Gly Gly Thr Gly Gly Cys Ala Ala Gly Cys Ala		1845		1850		1855
Gly Gly Cys Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly Ala Cys Gly Gly Thr Cys		1860		1865		1870
Cys Ala Gly Cys Gly Gly Cys Thr Gly Thr Thr Gly Cys Cys Gly Gly		1875		1880		1885
Thr Gly Cys Thr Gly Thr Gly Cys Cys Ala Gly Gly Cys Cys Cys Ala		1890		1895		1900
Cys Gly Gly Cys Thr Thr Gly Ala Cys Cys Cys Cys Gly Gly Ala Gly		1905		1910		1915
						1920

ES 2 740 903 T3

Cys Ala Gly Gly Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys Cys Ala Thr Cys Gly
 1925 1930 1935

Cys Cys Ala Gly Cys Cys Ala Cys Gly Ala Thr Gly Gly Cys Gly Gly
 1940 1945 1950

Cys Ala Ala Gly Cys Ala Gly Gly Cys Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly
 1955 1960 1965

Ala Cys Gly Gly Thr Cys Cys Ala Gly Cys Gly Gly Cys Thr Gly Thr
 1970 1975 1980

Thr Gly Cys Cys Gly Gly Thr Gly Cys Thr Gly Thr Gly Cys Cys Ala
 1985 1990 1995 2000

Gly Gly Cys Cys Cys Ala Cys Gly Gly Cys Thr Thr Gly Ala Cys Cys
 2005 2010 2015

Cys Cys Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Gly Thr Gly Gly Thr Gly Gly
 2020 2025 2030

Cys Cys Ala Thr Cys Gly Cys Cys Ala Gly Cys Ala Ala Thr Gly Gly
 2035 2040 2045

Cys Gly Gly Cys Gly Gly Cys Ala Gly Gly Cys Cys Gly Gly Cys Gly
 2050 2055 2060

Cys Thr Gly Gly Ala Gly Ala Gly Cys Ala Thr Thr Gly Thr Thr Gly
 2065 2070 2075 2080

Cys Cys Cys Ala Gly Thr Thr Ala Thr Cys Thr Cys Gly Cys Cys Cys
 2085 2090 2095

Thr Gly Ala Thr Cys Cys Gly Gly Cys Gly Thr Thr Gly Gly Cys Cys
 2100 2105 2110

Gly Cys Gly Thr Thr Gly Ala Cys Cys Ala Ala Cys Gly Ala Cys Cys
 2115 2120 2125

Ala Cys Cys Thr Cys Gly Thr Cys Gly Cys Cys Thr Thr Gly Gly Cys
 2130 2135 2140

Cys Thr Gly Cys Cys Thr Cys Gly Gly Cys Gly Gly Gly Cys Gly Thr
 2145 2150 2155 2160

Cys Cys Thr Gly Cys Gly Cys Thr Gly Gly Ala Thr Gly Cys Ala Gly
 2165 2170 2175

ES 2 740 903 T3

Thr Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly Ala Thr Thr Gly Gly Gly
 2180 2185 2190

Gly Gly Ala Thr Cys Cys Thr Ala Thr Cys Ala Gly Cys Cys Gly Thr
 2195 2200 2205

Thr Cys Cys Cys Ala Gly Cys Thr Gly Gly Thr Gly Ala Ala Gly Thr
 2210 2215 2220

Cys Cys Gly Ala Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Ala
 2225 2230 2235 2240

Gly Ala Ala Ala Thr Cys Cys Gly Ala Gly Thr Thr Gly Ala Gly Gly
 2245 2250 2255

Cys Ala Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Ala Ala Gly Thr Ala Cys Gly
 2260 2265 2270

Thr Gly Cys Cys Cys Cys Ala Cys Gly Ala Gly Thr Ala Cys Ala Thr
 2275 2280 2285

Cys Gly Ala Gly Cys Thr Gly Ala Thr Cys Gly Ala Gly Ala Thr Cys
 2290 2295 2300

Gly Cys Cys Cys Gly Gly Ala Ala Cys Ala Gly Cys Ala Cys Cys Cys
 2305 2310 2315 2320

Ala Gly Gly Ala Cys Cys Gly Thr Ala Thr Cys Cys Thr Gly Gly Ala
 2325 2330 2335

Gly Ala Thr Gly Ala Ala Gly Gly Thr Gly Ala Thr Gly Gly Ala Gly
 2340 2345 2350

Thr Thr Cys Thr Thr Cys Ala Thr Gly Ala Ala Gly Gly Thr Gly Thr
 2355 2360 2365

Ala Cys Gly Gly Cys Thr Ala Cys Ala Gly Gly Gly Gly Cys Ala Ala
 2370 2375 2380

Gly Cys Ala Cys Cys Thr Gly Gly Gly Cys Gly Gly Cys Thr Cys Cys
 2385 2390 2395 2400

Ala Gly Gly Ala Ala Gly Cys Cys Cys Gly Ala Cys Gly Gly Cys Gly
 2405 2410 2415

Cys Cys Ala Thr Cys Thr Ala Cys Ala Cys Cys Gly Thr Gly Gly Gly
 2420 2425 2430

ES 2 740 903 T3

Cys Thr Cys Cys Cys Cys Cys Ala Thr Cys Gly Ala Cys Thr Ala Cys
 2435 2440 2445

Gly Gly Cys Gly Thr Gly Ala Thr Cys Gly Thr Gly Gly Ala Cys Ala
 2450 2455 2460

Cys Cys Ala Ala Gly Gly Cys Cys Thr Ala Cys Thr Cys Cys Gly Gly
 2465 2470 2475 2480

Cys Gly Gly Cys Thr Ala Cys Ala Ala Cys Cys Thr Gly Cys Cys Cys
 2485 2490 2495

Ala Thr Cys Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Cys Cys Gly Ala Cys Gly
 2500 2505 2510

Ala Ala Ala Thr Gly Cys Ala Gly Ala Gly Gly Thr Ala Cys Gly Thr
 2515 2520 2525

Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Ala Cys Cys Ala Gly Ala Cys Cys
 2530 2535 2540

Ala Gly Gly Ala Ala Cys Ala Ala Gly Cys Ala Cys Ala Thr Cys Ala
 2545 2550 2555 2560

Ala Cys Cys Cys Cys Ala Ala Cys Gly Ala Gly Thr Gly Gly Thr Gly
 2565 2570 2575

Gly Ala Ala Gly Gly Thr Gly Thr Ala Cys Cys Cys Cys Thr Cys Cys
 2580 2585

Ala Gly Cys Gly Thr Gly Ala Cys Cys Gly Ala Gly Thr Thr Cys Ala
 2595 2600 2605

Ala Gly Thr Thr Cys Cys Thr Gly Thr Thr Cys Gly Thr Gly Thr Cys
 2610 2615 2620

Cys Gly Gly Cys Cys Ala Cys Thr Thr Cys Ala Ala Gly Gly Gly Cys
 2625 2630 2635 2640

Ala Ala Cys Thr Ala Cys Ala Ala Gly Gly Cys Cys Cys Ala Gly Cys
 2645 2650 2655

Thr Gly Ala Cys Cys Ala Gly Gly Cys Thr Gly Ala Ala Cys Cys Ala
 2660 2665 2670

Cys Ala Thr Cys Ala Cys Cys Ala Ala Cys Thr Gly Cys Ala Ala Cys

ES 2 740 903 T3

2675	2680	2685
Gly Gly Cys Gly Cys Cys 2690	Gly Thr Gly Cys Thr 2695	Gly Thr Cys Cys Gly 2700
Thr Gly Gly Ala Gly Gly Ala 2705	Gly Cys Thr Cys Cys Thr 2710	Gly Ala Thr 2715
Cys Gly Gly Cys Gly Gly Cys 2725	Gly Ala Gly Ala Thr 2730	Gly Ala Thr Cys 2735
Ala Ala Gly Gly Cys Cys Gly 2740	Gly Gly Cys Ala Cys Cys 2745	Cys Thr Gly Ala 2750
Cys Cys Cys Thr Gly Gly Ala 2755	Gly Gly Ala Gly Gly Thr 2760	Gly Ala Gly 2765
Gly Ala Gly Gly Ala Ala Gly 2770	Thr Thr Cys Ala Ala Cys 2775	Ala Ala Cys 2780
Gly Gly Cys Gly Ala Gly Ala 2785	Thr Cys Ala Ala Cys Thr 2790	Thr Thr Cys Gly 2795
Cys Gly Gly Cys Cys Gly Ala 2805	Cys Thr Gly Ala Thr Ala 2810	

<210> 53
 <211> 2832
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> polinucleótido que codifica NTALE TRAC_T01-R

<400> 53

Ala Thr Gly Gly Gly Cys Gly Ala Thr Cys Cys Thr Ala Ala Ala Ala 1 5 10 15
Ala Gly Ala Ala Ala Cys Gly Thr Ala Ala Gly Gly Thr Cys Ala Thr 20 25 30
Cys Gly Ala Thr Ala Ala Gly Gly Ala Gly Ala Cys Cys Gly Cys Cys 35 40 45
Gly Cys Thr Gly Cys Cys Ala Ala Gly Thr Thr Cys Gly Ala Gly Ala 50 55 60
Gly Ala Cys Ala Gly Cys Ala Cys Ala Thr Gly Gly Ala Cys Ala Gly 65 70 75 80

ES 2 740 903 T3

Cys Ala Thr Cys Gly Ala Thr Ala Thr Cys Gly Cys Cys Gly Ala Thr
 85 90 95
 Cys Thr Ala Cys Gly Cys Ala Cys Gly Cys Thr Cys Gly Gly Cys Thr
 100 105 110
 Ala Cys Ala Gly Cys Cys Ala Gly Cys Ala Gly Cys Ala Ala Cys Ala
 115 120 125
 Gly Gly Ala Gly Ala Ala Gly Ala Thr Cys Ala Ala Ala Cys Cys Gly
 130 135 140
 Ala Ala Gly Gly Thr Thr Cys Gly Thr Thr Cys Gly Ala Cys Ala Gly
 145 150 155 160
 Thr Gly Gly Cys Gly Cys Ala Gly Cys Ala Cys Cys Ala Cys Gly Ala
 165 170 175
 Gly Gly Cys Ala Cys Thr Gly Gly Thr Cys Gly Gly Cys Cys Ala Cys
 180 185 190
 Gly Gly Gly Thr Thr Thr Ala Cys Ala Cys Ala Cys Gly Cys Gly Cys
 195 200 205
 Ala Cys Ala Thr Cys Gly Thr Thr Gly Cys Gly Thr Thr Ala Ala Gly
 210 215 220
 Cys Cys Ala Ala Cys Ala Cys Cys Cys Gly Gly Cys Ala Gly Cys Gly
 225 230 235 240
 Thr Thr Ala Gly Gly Gly Ala Cys Cys Gly Thr Cys Gly Cys Thr Gly
 245 250 255
 Thr Cys Ala Ala Gly Thr Ala Thr Cys Ala Gly Gly Ala Cys Ala Thr
 260 265 270
 Gly Ala Thr Cys Gly Cys Ala Gly Cys Gly Thr Thr Gly Cys Cys Ala
 275 280 285
 Gly Ala Gly Gly Cys Gly Ala Cys Ala Cys Ala Cys Gly Ala Ala Gly
 290 295 300
 Cys Gly Ala Thr Cys Gly Thr Thr Gly Gly Cys Gly Thr Cys Gly Gly
 305 310 315 320
 Cys Ala Ala Ala Cys Ala Gly Thr Gly Gly Thr Cys Cys Gly Gly Cys

ES 2 740 903 T3

				325						330						335
Gly	Cys	Ala	Cys	Gly	Cys	Gly	Cys	Thr	Cys	Thr	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	
			340					345					350			
Cys	Cys	Thr	Thr	Gly	Cys	Thr	Cys	Ala	Cys	Gly	Gly	Thr	Gly	Gly	Cys	
		355					360					365				
Gly	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Thr	Thr	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Thr	
	370					375					380					
Cys	Cys	Ala	Cys	Cys	Gly	Thr	Thr	Ala	Cys	Ala	Gly	Thr	Thr	Gly	Gly	
385					390					395					400	
Ala	Cys	Ala	Cys	Ala	Gly	Gly	Cys	Cys	Ala	Ala	Cys	Thr	Thr	Cys	Thr	
				405					410					415		
Cys	Ala	Ala	Gly	Ala	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala	Ala	Ala	Ala	Cys	Gly	Thr	
			420					425					430			
Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Cys	Gly	Thr	Gly	Ala	Cys	Cys	Gly	Cys	Ala	Gly	
		435					440					445				
Thr	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Cys	Ala	Gly	Thr	Gly	Cys	Ala	Thr	Gly	Cys	
	450					455					460					
Ala	Thr	Gly	Gly	Cys	Gly	Cys	Ala	Ala	Thr	Gly	Cys	Ala	Cys	Thr	Gly	
465					470					475					480	
Ala	Cys	Gly	Gly	Gly	Thr	Gly	Cys	Cys	Cys	Cys	Gly	Cys	Thr	Cys	Ala	
				485					490					495		
Ala	Cys	Thr	Thr	Gly	Ala	Cys	Cys	Cys	Cys	Gly	Gly	Ala	Gly	Cys	Ala	
			500					505					510			
Gly	Gly	Thr	Gly	Gly	Thr	Gly	Gly	Cys	Cys	Ala	Thr	Cys	Gly	Cys	Cys	
		515					520					525				
Ala	Gly	Cys	Cys	Ala	Cys	Gly	Ala	Thr	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Cys	Ala	
	530					535					540					
Ala	Gly	Cys	Ala	Gly	Gly	Cys	Gly	Cys	Thr	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Cys	
545					550					555					560	
Gly	Gly	Thr	Cys	Cys	Ala	Gly	Cys	Gly	Gly	Cys	Thr	Gly	Thr	Thr	Gly	
				565					570					575		

ES 2 740 903 T3

Cys Cys Gly Gly Thr Gly Cys Thr Gly Thr Gly Cys Cys Ala Gly Gly
 580 585 590

Cys Cys Cys Ala Cys Gly Gly Cys Thr Thr Gly Ala Cys Cys Cys Cys
 595 600 605

Cys Cys Ala Gly Cys Ala Gly Gly Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys Cys
 610 615 620

Ala Thr Cys Gly Cys Cys Ala Gly Cys Ala Ala Thr Gly Gly Cys Gly
 625 630 635 640

Gly Thr Gly Gly Cys Ala Ala Gly Cys Ala Gly Gly Cys Gly Cys Thr
 645 650 655

Gly Gly Ala Gly Ala Cys Gly Gly Thr Cys Cys Ala Gly Cys Gly Gly
 660 665 670

Cys Thr Gly Thr Thr Gly Cys Cys Gly Gly Thr Gly Cys Thr Gly Thr
 675 680 685

Gly Cys Cys Ala Gly Gly Cys Cys Cys Ala Cys Gly Gly Cys Thr Thr
 690 695 700

Gly Ala Cys Cys Cys Cys Gly Gly Ala Gly Cys Ala Gly Gly Thr Gly
 705 710 715 720

Gly Thr Gly Gly Cys Cys Ala Thr Cys Gly Cys Cys Ala Gly Cys Cys
 725 730 735

Ala Cys Gly Ala Thr Gly Gly Cys Gly Gly Cys Ala Ala Gly Cys Ala
 740 745 750

Gly Gly Cys Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly Ala Cys Gly Gly Thr Cys
 755 760 765

Cys Ala Gly Cys Gly Gly Cys Thr Gly Thr Thr Gly Cys Cys Gly Gly
 770 775 780

Thr Gly Cys Thr Gly Thr Gly Cys Cys Ala Gly Gly Cys Cys Cys Ala
 785 790 795 800

Cys Gly Gly Cys Thr Thr Gly Ala Cys Cys Cys Gly Gly Ala Gly
 805 810 815

Cys Ala Gly Gly Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys Cys Ala Thr Cys Gly
 820 825 830

ES 2 740 903 T3

Cys Cys Ala Gly Cys Ala Ala Thr Ala Thr Thr Gly Gly Thr Gly Gly
835 840 845

Cys Ala Ala Gly Cys Ala Gly Gly Cys Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly
850 855 860

Ala Cys Gly Gly Thr Gly Cys Ala Gly Gly Cys Gly Cys Thr Gly Thr
865 870 875 880

Thr Gly Cys Cys Gly Gly Thr Gly Cys Thr Gly Thr Gly Cys Cys Ala
885 890 895

Gly Gly Cys Cys Cys Ala Cys Gly Gly Cys Thr Thr Gly Ala Cys Cys
900 905 910

Cys Cys Cys Cys Ala Gly Cys Ala Gly Gly Thr Gly Gly Thr Gly Gly
915 920 925

Cys Cys Ala Thr Cys Gly Cys Cys Ala Gly Cys Ala Ala Thr Ala Ala
930 935 940

Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys Ala Ala Gly Cys Ala Gly Gly Cys Gly
945 950 955 960

Cys Thr Gly Gly Ala Gly Ala Cys Gly Gly Thr Cys Cys Ala Gly Cys
965 970 975

Gly Gly Cys Thr Gly Thr Thr Gly Cys Cys Gly Gly Thr Gly Cys Thr
980 985 990

Gly Thr Gly Cys Cys Ala Gly Gly Cys Cys Cys Ala Cys Gly Gly Cys
995 1000 1005

Thr Thr Gly Ala Cys Cys Cys Cys Gly Gly Ala Gly Cys Ala Gly Gly
1010 1015 1020

Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys Cys Ala Thr Cys Gly Cys Cys Ala Gly
1025 1030 1035 1040

Cys Cys Ala Cys Gly Ala Thr Gly Gly Cys Gly Gly Cys Ala Ala Gly
1045 1050 1055

Cys Ala Gly Gly Cys Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly Ala Cys Gly Gly
1060 1065 1070

Thr Cys Cys Ala Gly Cys Gly Gly Cys Thr Gly Thr Thr Gly Cys Cys
1075 1080 1085

ES 2 740 903 T3

Gly Gly Thr Gly Cys Thr Gly Thr Gly Cys Cys Ala Gly Gly Cys Cys
 1090 1095 1100

Cys Ala Cys Gly Gly Cys Thr Thr Gly Ala Cys Cys Cys Cys Cys
 1105 1110 1115 1120

Ala Gly Cys Ala Gly Gly Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys Cys Ala Thr
 1125 1130 1135

Cys Gly Cys Cys Ala Gly Cys Ala Ala Thr Gly Gly Cys Gly Gly Thr
 1140 1145 1150

Gly Gly Cys Ala Ala Gly Cys Ala Gly Gly Cys Gly Cys Thr Gly Gly
 1155 1160 1165

Ala Gly Ala Cys Gly Gly Thr Cys Cys Ala Gly Cys Gly Gly Cys Thr
 1170 1175 1180

Gly Thr Thr Gly Cys Cys Gly Gly Thr Gly Cys Thr Gly Thr Gly Cys
 1185 1190 1195 1200

Cys Ala Gly Gly Cys Cys Cys Ala Cys Gly Gly Cys Thr Thr Gly Ala
 1205 1210 1215

Cys Cys Cys Cys Cys Cys Ala Gly Cys Ala Gly Gly Thr Gly Gly Thr
 1220 1225 1230

Gly Gly Cys Cys Ala Thr Cys Gly Cys Cys Ala Gly Cys Ala Ala Thr
 1235 1240 1245

Ala Ala Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys Ala Ala Gly Cys Ala Gly Gly
 1250 1255 1260

Cys Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly Ala Cys Gly Gly Thr Cys Cys Ala
 1265 1270 1275 1280

Gly Cys Gly Gly Cys Thr Gly Thr Thr Gly Cys Cys Gly Gly Thr Gly
 1285 1290 1295

Cys Thr Gly Thr Gly Cys Cys Ala Gly Gly Cys Cys Cys Ala Cys Gly
 1300 1305 1310

Gly Cys Thr Thr Gly Ala Cys Cys Cys Cys Cys Ala Gly Cys Ala
 1315 1320 1325

Gly Gly Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys Cys Ala Thr Cys Gly Cys Cys

ES 2 740 903 T3

1330	1335	1340
Ala Gly Cys Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys Ala 1345	1350	1355
Ala Gly Cys Ala Gly Gly Cys Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly Ala Cys 1365	1370	1375
Gly Gly Thr Cys Cys Ala Gly Cys Gly Gly Cys Thr Gly Thr Thr Gly 1380	1385	1390
Cys Cys Gly Gly Thr Gly Cys Thr Gly Thr Gly Cys Cys Ala Gly Gly 1395	1400	1405
Cys Cys Cys Ala Cys Gly Gly Cys Thr Thr Gly Ala Cys Cys Cys Cys 1410	1415	1420
Cys Cys Ala Gly Cys Ala Gly Gly Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys Cys 1425	1430	1435
Ala Thr Cys Gly Cys Cys Ala Gly Cys Ala Ala Thr Gly Gly Cys Gly 1445	1450	1455
Gly Thr Gly Gly Cys Ala Ala Gly Cys Ala Gly Gly Cys Gly Cys Thr 1460	1465	1470
Gly Gly Ala Gly Ala Cys Gly Gly Thr Cys Cys Ala Gly Cys Gly Gly 1475	1480	1485
Cys Thr Gly Thr Thr Gly Cys Cys Gly Gly Thr Gly Cys Thr Gly Thr 1490	1495	1500
Gly Cys Cys Ala Gly Gly Cys Cys Cys Ala Cys Gly Gly Cys Thr Thr 1505	1510	1515
Gly Ala Cys Cys Cys Cys Gly Gly Ala Gly Cys Ala Gly Gly Thr Gly 1525	1530	1535
Gly Thr Gly Gly Cys Cys Ala Thr Cys Gly Cys Cys Ala Gly Cys Ala 1540	1545	1550
Ala Thr Ala Thr Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys Ala Ala Gly Cys Ala 1555	1560	1565
Gly Gly Cys Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly Ala Cys Gly Gly Thr Gly 1570	1575	1580

ES 2 740 903 T3

Cys Ala Gly Gly Cys Gly Cys Thr Gly Thr Thr Gly Cys Cys Gly Gly
 1585 1590 1595 1600

Thr Gly Cys Thr Gly Thr Gly Cys Cys Ala Gly Gly Cys Cys Cys Ala
 1605 1610 1615

Cys Gly Gly Cys Thr Thr Gly Ala Cys Cys Cys Cys Gly Gly Ala Gly
 1620 1625 1630

Cys Ala Gly Gly Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys Cys Ala Thr Cys Gly
 1635 1640 1645

Cys Cys Ala Gly Cys Cys Ala Cys Gly Ala Thr Gly Gly Cys Gly Gly
 1650 1655 1660

Cys Ala Ala Gly Cys Ala Gly Gly Cys Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly
 1665 1670 1675 1680

Ala Cys Gly Gly Thr Cys Cys Ala Gly Cys Gly Gly Cys Thr Gly Thr
 1685 1690 1695

Thr Gly Cys Cys Gly Gly Thr Gly Cys Thr Gly Thr Gly Cys Cys Ala
 1700 1705 1710

Gly Gly Cys Cys Cys Ala Cys Gly Gly Cys Thr Thr Gly Ala Cys Cys
 1715 1720 1725

Cys Cys Gly Gly Ala Gly Cys Ala Gly Gly Thr Gly Gly Thr Gly Gly
 1730 1735 1740

Cys Cys Ala Thr Cys Gly Cys Cys Ala Gly Cys Ala Ala Thr Ala Thr
 1745 1750 1755 1760

Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys Ala Ala Gly Cys Ala Gly Gly Cys Gly
 1765 1770 1775

Cys Thr Gly Gly Ala Gly Ala Cys Gly Gly Thr Gly Cys Ala Gly Gly
 1780 1785 1790

Cys Gly Cys Thr Gly Thr Thr Gly Cys Cys Gly Gly Thr Gly Cys Thr
 1795 1800 1805

Gly Thr Gly Cys Cys Ala Gly Gly Cys Cys Cys Ala Cys Gly Gly Cys
 1810 1815 1820

Thr Thr Gly Ala Cys Cys Cys Cys Gly Gly Ala Gly Cys Ala Gly Gly
 1825 1830 1835 1840

ES 2 740 903 T3

Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys Cys Ala Thr Cys Gly Cys Cys Ala Gly
 1845 1850 1855

Cys Cys Ala Cys Gly Ala Thr Gly Gly Cys Gly Gly Cys Ala Ala Gly
 1860 1865 1870

Cys Ala Gly Gly Cys Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly Ala Cys Gly Gly
 1875 1880 1885

Thr Cys Cys Ala Gly Cys Gly Gly Cys Thr Gly Thr Thr Gly Cys Cys
 1890 1895 1900

Gly Gly Thr Gly Cys Thr Gly Thr Gly Cys Cys Ala Gly Gly Cys Cys
 1905 1910 1915 1920

Cys Ala Cys Gly Gly Cys Thr Thr Gly Ala Cys Cys Cys Cys Cys Cys
 1925 1930 1935

Ala Gly Cys Ala Gly Gly Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys Cys Ala Thr
 1940 1945 1950

Cys Gly Cys Cys Ala Gly Cys Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Gly Thr
 1955 1960 1965

Gly Gly Cys Ala Ala Gly Cys Ala Gly Gly Cys Gly Cys Thr Gly Gly
 1970 1975 1980

Ala Gly Ala Cys Gly Gly Thr Cys Cys Ala Gly Cys Gly Gly Cys Thr
 1985 1990 1995 2000

Gly Thr Thr Gly Cys Cys Gly Gly Thr Gly Cys Thr Gly Thr Gly Cys
 2005 2010 2015

Cys Ala Gly Gly Cys Cys Cys Ala Cys Gly Gly Cys Thr Thr Gly Ala
 2020 2025 2030

Cys Cys Cys Cys Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Gly Thr Gly Gly Thr
 2035 2040 2045

Gly Gly Cys Cys Ala Thr Cys Gly Cys Cys Ala Gly Cys Ala Ala Thr
 2050 2055 2060

Gly Gly Cys Gly Gly Cys Gly Gly Cys Ala Gly Gly Cys Cys Gly Gly
 2065 2070 2075 2080

Cys Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly Ala Gly Cys Ala Thr Thr Gly Thr
 2085 2090 2095

ES 2 740 903 T3

Thr Gly Cys Cys Cys Ala Gly Thr Thr Ala Thr Cys Thr Cys Gly Cys
 2100 2105 2110

Cys Cys Thr Gly Ala Thr Cys Cys Gly Gly Cys Gly Thr Thr Gly Gly
 2115 2120 2125

Cys Cys Gly Cys Gly Thr Thr Gly Ala Cys Cys Ala Ala Cys Gly Ala
 2130 2135 2140

Cys Cys Ala Cys Cys Thr Cys Gly Thr Cys Gly Cys Cys Thr Thr Gly
 2145 2150 2155 2160

Gly Cys Cys Thr Gly Cys Cys Thr Cys Gly Gly Cys Gly Gly Gly Cys
 2165 2170 2175

Gly Thr Cys Cys Thr Gly Cys Gly Cys Thr Gly Gly Ala Thr Gly Cys
 2180 2185 2190

Ala Gly Thr Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly Ala Thr Thr Gly
 2195 2200 2205

Gly Gly Gly Gly Ala Thr Cys Cys Thr Ala Thr Cys Ala Gly Cys Cys
 2210 2215 2220

Gly Thr Thr Cys Cys Cys Ala Gly Cys Thr Gly Gly Thr Gly Ala Ala
 2225 2230 2235 2240

Gly Thr Cys Cys Gly Ala Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly
 2245 2250 2255

Ala Ala Gly Ala Ala Ala Thr Cys Cys Gly Ala Gly Thr Thr Gly Ala
 2260 2265 2270

Gly Gly Cys Ala Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Ala Ala Gly Thr Ala
 2275 2280 2285

Cys Gly Thr Gly Cys Cys Cys Cys Ala Cys Gly Ala Gly Thr Ala Cys
 2290 2295 2300

Ala Thr Cys Gly Ala Gly Cys Thr Gly Ala Thr Cys Gly Ala Gly Ala
 2305 2310 2315 2320

Thr Cys Gly Cys Cys Cys Gly Gly Ala Ala Cys Ala Gly Cys Ala Cys
 2325 2330 2335

Cys Cys Ala Gly Gly Ala Cys Cys Gly Thr Ala Thr Cys Cys Thr Gly

ES 2 740 903 T3

2340	2345	2350
Gly Ala Gly Ala Thr Gly Ala Ala Gly Gly Thr Gly Ala Thr Gly Gly 2355 2360 2365		
Ala Gly Thr Thr Cys Thr Thr Cys Ala Thr Gly Ala Ala Gly Gly Thr 2370 2375 2380		
Gly Thr Ala Cys Gly Gly Cys Thr Ala Cys Ala Gly Gly Gly Gly Cys 2385 2390 2395 2400		
Ala Ala Gly Cys Ala Cys Cys Thr Gly Gly Gly Cys Gly Gly Cys Thr 2405 2410 2415		
Cys Cys Ala Gly Gly Ala Ala Gly Cys Cys Cys Gly Ala Cys Gly Gly 2420 2425 2430		
Cys Gly Cys Cys Ala Thr Cys Thr Ala Cys Ala Cys Cys Gly Thr Gly 2435 2440 2445		
Gly Gly Cys Thr Cys Cys Cys Cys Cys Ala Thr Cys Gly Ala Cys Thr 2450 2455 2460		
Ala Cys Gly Gly Cys Gly Thr Gly Ala Thr Cys Gly Thr Gly Gly Ala 2465 2470 2475 2480		
Cys Ala Cys Cys Ala Ala Gly Gly Cys Cys Thr Ala Cys Thr Cys Cys 2485 2490 2495		
Gly Gly Cys Gly Gly Cys Thr Ala Cys Ala Ala Cys Cys Thr Gly Cys 2500 2505 2510		
Cys Cys Ala Thr Cys Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Cys Cys Gly Ala 2515 2520 2525		
Cys Gly Ala Ala Ala Thr Gly Cys Ala Gly Ala Gly Gly Thr Ala Cys 2530 2535 2540		
Gly Thr Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Ala Cys Cys Ala Gly Ala 2545 2550 2555 2560		
Cys Cys Ala Gly Gly Ala Ala Cys Ala Ala Gly Cys Ala Cys Ala Thr 2565 2570 2575		
Cys Ala Ala Cys Cys Cys Cys Ala Ala Cys Gly Ala Gly Thr Gly Gly 2580 2585 2590		

ES 2 740 903 T3

Thr Gly Gly Ala Ala Gly Gly Thr Gly Thr Ala Cys Cys Cys Cys Thr
 2595 2600 2605

Cys Cys Ala Gly Cys Gly Thr Gly Ala Cys Cys Gly Ala Gly Thr Thr
 2610 2615 2620

Cys Ala Ala Gly Thr Thr Cys Cys Thr Gly Thr Thr Cys Gly Thr Gly
 2625 2630 2635 2640

Thr Cys Cys Gly Gly Cys Cys Ala Cys Thr Thr Cys Ala Ala Gly Gly
 2645 2650 2655

Gly Cys Ala Ala Cys Thr Ala Cys Ala Ala Gly Gly Cys Cys Cys Ala
 2660 2665 2670

Gly Cys Thr Gly Ala Cys Cys Ala Gly Gly Cys Thr Gly Ala Ala Cys
 2675 2680 2685

Cys Ala Cys Ala Thr Cys Ala Cys Cys Ala Ala Cys Thr Gly Cys Ala
 2690 2695 2700

Ala Cys Gly Gly Cys Gly Cys Cys Gly Thr Gly Cys Thr Gly Thr Cys
 2705 2710 2715 2720

Cys Gly Thr Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Cys Thr Cys Cys Thr Gly
 2725 2730 2735

Ala Thr Cys Gly Gly Cys Gly Gly Cys Gly Ala Gly Ala Thr Gly Ala
 2740 2745 2750

Thr Cys Ala Ala Gly Gly Cys Cys Gly Gly Cys Ala Cys Cys Cys Thr
 2755 2760 2765

Gly Ala Cys Cys Cys Thr Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Thr Gly
 2770 2775 2780

Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Ala Gly Thr Thr Cys Ala Ala Cys Ala
 2785 2790 2795 2800

Ala Cys Gly Gly Cys Gly Ala Gly Ala Thr Cys Ala Ala Cys Thr Thr
 2805 2810 2815

Cys Gly Cys Gly Gly Cys Cys Gly Ala Cys Thr Gly Ala Thr Ala Ala
 2820 2825 2830

<210> 54
 <211> 113
 <212> PRT

ES 2 740 903 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> scFv humanizado Klon43 Variante VL1

5

<400> 54

Met Ala Asp Tyr Lys Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val
1 5 10 15

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln
20 25 30

Asn Val Asp Ser Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
35 40 45

Pro Lys Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro
50 55 60

Ser Arg Phe Ser Gly Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80

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

Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

10

<210> 55

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> scFv humanizado Klon43 Variante VL2

<400> 55

Met Ala Asp Tyr Lys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val
1 5 10 15

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln
20 25 30

Asn Val Asp Ser Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
35 40 45

20

ES 2 740 903 T3

Pro Lys Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro
50 55 60

Ser Arg Phe Ser Gly Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80

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

Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 56
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> scFv humanizado Klon43 Variante VL3

<400> 56

Met Ala Asp Tyr Lys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val
1 5 10 15

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln
20 25 30

Asn Val Asp Ser Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
35 40 45

Pro Lys Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro
50 55 60

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80

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

Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 57
<211> 113
<212> PRT

ES 2 740 903 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> scFv humanizado Klon43 Variante VL4

5

<400> 57

Met Ala Asp Tyr Lys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val
1 5 10 15

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln
20 25 30

Asn Val Asp Ser Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro
50 55 60

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80

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

Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

10

<210> 58

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> scFv humanizado Klon43 Variante VL5

<400> 58

Met Ala Asp Tyr Lys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val
1 5 10 15

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln
20 25 30

Asn Val Asp Ser Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
35 40 45

20

ES 2 740 903 T3

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

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75 80

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

Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 59
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> scFv humanizado Klon43 Variante VL6

<400> 59

Met Ala Asp Tyr Lys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val
 1 5 10 15

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln
 20 25 30

Asn Val Asp Ser Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Gly Gln Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75 80

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

Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 60
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 740 903 T3

<220>

<223> scFv humanizado Klon43 variante VH1

5 <400> 60

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

<210> 61

10 <211> 127

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> scFv humanizado Klon43 variante VH2

<400> 61

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

20

ES 2 740 903 T3

Gly Leu Ile Arg Ser Lys Ala Asp Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile
 65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Ser Pro Glu Gly
 100 105 110

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 62
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> scFv humanizado Klon43 variante VH3

<400> 62

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Leu Ile Arg Ser Lys Ala Asp Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile
 65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Ser Pro Glu Gly
 100 105 110

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 63
 <211> 127

ES 2 740 903 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> scFv humanizado Klon43 variante VH4

<400> 63

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Phe Ile Arg Ser Lys Ala Asp Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile
 65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Ser Pro Glu Gly
 100 105 110

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

10 <210> 64
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> scFv humanizado Klon43 variante VH5

<400> 64

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

ES 2 740 903 T3

Gly Phe Ile Arg Ser Lys Ala Asp Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile
65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Ser Pro Glu Gly
100 105 110

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 65

<211> 127

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> scFv humanizado Klon43 variante VH6

<400> 65

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Leu Ile Arg Ser Lys Ala Asp Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile
65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Ser Pro Glu Gly
100 105 110

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

15 <210> 66
<211> 127

ES 2 740 903 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 5 <223> scFv humanizado Klon43 variante VH7

<400> 66

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Phe Ile Arg Ser Lys Ala Asp Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile
 65 70 75 80

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

Tyr Cys Thr Arg Asp Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Ser Pro Glu Gly
 100 105 110

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

10
 <210> 67
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15
 <220>
 <223> CDR1

20
 <400> 67

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr
 1 5

25
 <210> 68
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> CDR2

<400> 68

ES 2 740 903 T3

Arg Ser Lys Ala Asp Gly Tyr Thr Thr
1 5

5 <210> 69
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> CDR3
<400> 69

Ala Arg Asp Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Ser Pro Glu Gly Ala Met
1 5 10 15

Asp Tyr

15 <210> 70
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> CDR4
<400> 70

Gln Asn Val Asp Ser Ala
1 5

25 <210> 71
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> CDR5
<400> 71

Ser Ala Ser
1

35 <210> 72
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> CDR6
<400> 72

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
1 5

45 <210> 73
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50

ES 2 740 903 T3

<220>

<223> hVH Klo43-3 genérico

<400> 73

5

Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Xaa
35 40 45

Xaa Xaa Ile Arg Ser Lys Ala Asp Gly Tyr Thr Thr Xaa Xaa Xaa Xaa
50 55 60

Xaa
65 70 75 80

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Arg Asp Ala Ala Tyr Tyr Ser
85 90 95

Tyr Tyr Ser Pro Glu Gly Ala Met Asp Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
100 105 110

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
115

<210> 74

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> hVL Klo43-3 genérico

<400> 74

15

Xaa
1 5 10 15

Xaa Gln
20 25 30

ES 2 740 903 T3

Asn Val Asp Ser Ala Xaa
 35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60

Xaa
 65 70 75 80

Xaa Gln Gln Tyr
 85 90 95

Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Xaa
 100 105 110

<210> 75
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Klo43-1+SP

10

<400> 75

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
 20 25 30

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

Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 50 55 60

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

Thr Glu Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Arg Asp
 85 90 95

Asp Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu Arg Pro Glu
 100 105 110

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

ES 2 740 903 T3

Tyr Ser Pro Glu Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
 130 135 140
 Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 145 150 155 160
 Gly Gly Ser Met Ala Asp Tyr Lys Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His
 165 170 175
 Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Asn Ile Thr Cys Lys
 180 185 190
 Ala Ser Gln Asn Val Asp Ser Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 195 200 205
 Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
 210 215 220
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 225 230 235 240
 Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys
 245 250 255
 Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 260 265 270
 Glu Ile Lys Arg Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro
 275 280 285
 Pro Gly Tyr Gln Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly
 290 295 300
 Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg
 305 310 315 320
 Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln
 325 330 335
 Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu
 340 345 350
 Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala
 355 360 365
 Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
 370 375 380

ES 2 740 903 T3

Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp
 385 390 395 400

Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu
 405 410 415

Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile
 420 425 430

Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
 435 440 445

Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
 450 455 460

Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 465 470

<210> 76
 <211> 499
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> K1o43-3+SP

<400> 76

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
 20 25 30

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

Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 50 55 60

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

Thr Glu Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Arg Asp
 85 90 95

Asp Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu Arg Pro Glu
 100 105 110

5

10

ES 2 740 903 T3

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

ES 2 740 903 T3

Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly
 370 375 380

Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
 385 390 395 400

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

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

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

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

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

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

Pro Pro Arg

5 <210> 77
 <211> 685
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Klo43-5+SP

<400> 77

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
 20 25 30

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

Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 50 55 60

15

ES 2 740 903 T3

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

Thr Glu Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Arg Asp
85 90 95

Asp Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu Arg Pro Glu
100 105 110

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

Tyr Ser Pro Glu Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
130 135 140

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

Gly Gly Ser Met Ala Asp Tyr Lys Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His
165 170 175

Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Asn Ile Thr Cys Lys
180 185 190

Ala Ser Gln Asn Val Asp Ser Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
195 200 205

Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
210 215 220

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
225 230 235 240

Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys
245 250 255

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
260 265 270

Glu Ile Lys Arg Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
275 280 285

Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
290 295 300

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr
305 310 315 320

ES 2 740 903 T3

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 325 330 335
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 340 345 350
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 355 360 365
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 370 375 380
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 385 390 395 400
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 405 410 415
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 420 425 430
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 435 440 445
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 450 455 460
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 465 470 475 480
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 485 490 495
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ile Tyr Ile Trp Ala
 500 505 510
 Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr
 515 520 525
 Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln
 530 535 540
 Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser
 545 550 555 560
 Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys
 565 570 575

ES 2 740 903 T3

Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln
 580 585 590

Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
 595 600 605

Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg
 610 615 620

Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met
 625 630 635 640

Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly
 645 650 655

Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp
 660 665 670

Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 675 680 685

REIVINDICACIONES

1. Un receptor antigénico quimérico (CAR) específico de CD123, que tiene una estructura polipeptídica que comprende un dominio de unión a ligando extracelular que comprende una región variable de cadena pesada (V_H) y una región variable de cadena ligera (V_L) de un anticuerpo monoclonal anti-CD123, una bisagra de Fc γ RIII α , CD8 α o IgG1, un dominio transmembrana CD8 α , y un dominio citoplasmático que incluye un dominio de señalización CD3 ζ y un dominio coestimulador de 4-1BB, en donde dicha V_H comprende las secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 67, 68 y 69 y dicha V_L comprende las secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 70, 71 y 72.
2. El CAR específico de CD123 según la reivindicación 1, en donde dicho CAR tiene una identidad de secuencia de al menos 80 % con la SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44 o SEQ ID NO: 46, respectivamente.
3. El CAR específico de CD123 según la reivindicación 1, en donde dicho CAR comprende una bisagra de CD8 α y tiene una identidad de secuencia de al menos 80 % con la SEQ ID NO: 44.
4. El receptor antigénico quimérico específico de CD123 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dichas V_H y V_L comprenden las secuencias
- XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXGFTFTDYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXIRSKAD
GYTTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXARDAAYSYSPGAMDYXXXXXXXXXXXXX (SEQ ID NO: 73) y
- XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXQNVDSAXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXSASXXX
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXQYYPSTPWTXXXXXXXXXXXXX (SEQ ID NO: 74), respectivamente, en donde X es un aminoácido.
5. El CAR específico de CD123 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dichas V_H y V_L tienen una identidad de al menos 80 % con las SEQ ID NO: 19 y 20, respectivamente.
6. El receptor antigénico quimérico específico de CD123 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha V_H tiene una secuencia polipeptídica seleccionada de SEQ ID NO: 60, 61, 62, 63, 64, 65 y 66 y dicha V_L tiene una secuencia polipeptídica seleccionada de SEQ ID NO: 54, 55, 56, 57, 58 y 59.
7. El CAR específico de CD123 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que adicionalmente comprende un péptido señal, preferentemente de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
8. Un polinucleótido que codifica un receptor antigénico quimérico específico de CD123 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Una célula inmunitaria modificada por ingeniería genética que expresa en la membrana de la superficie celular un receptor antigénico quimérico específico de CD123 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
10. La célula inmunitaria modificada por ingeniería genética según la reivindicación 9, procedente de linfocitos T, opcionalmente resistente a un fármaco contra el cáncer y que lleva una delección en un gen que codifica un TCR alfa o un TCR beta.
11. La célula inmunitaria modificada por ingeniería genética según la reivindicación 9 o 10, en donde la expresión de al menos una proteína del MHC, preferentemente β 2m o HLA, se suprime en dicha célula inmunitaria.
12. La célula inmunitaria modificada por ingeniería genética según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde dicha célula está mutada para conferir resistencia a al menos un fármaco inmunosupresor, un fármaco quimioterapéutico o un fármaco contra el cáncer.
13. La célula inmunitaria modificada por ingeniería genética según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 para su uso en terapia.
14. La célula inmunitaria modificada por ingeniería genética según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 para su uso en terapia de leucemia, en donde dicha leucemia se selecciona del grupo que consiste en leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, síndrome mielodisplásico, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica y síndrome mielodisplásico.
15. La célula modificada por ingeniería genética para su uso en terapia según la reivindicación 14, en donde la leucemia es leucemia mielógena aguda (LMA).
16. La célula modificada por ingeniería genética según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 para uso en terapia de linfoma, en donde dicho linfoma se selecciona del grupo que consiste en mieloma múltiple, linfoma no Hodgkin, linfoma de Burkitt y linfoma folicular (células pequeñas y células grandes).

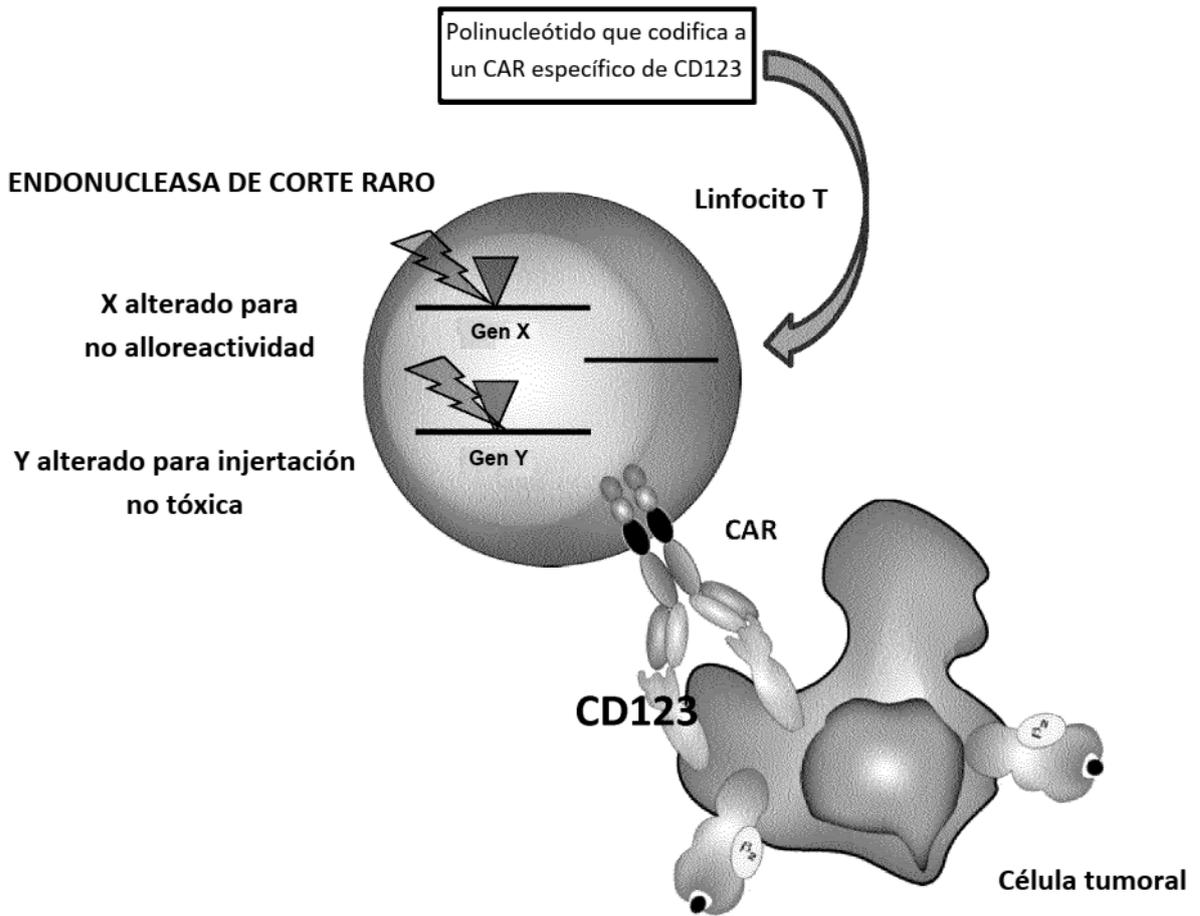


Figura 1

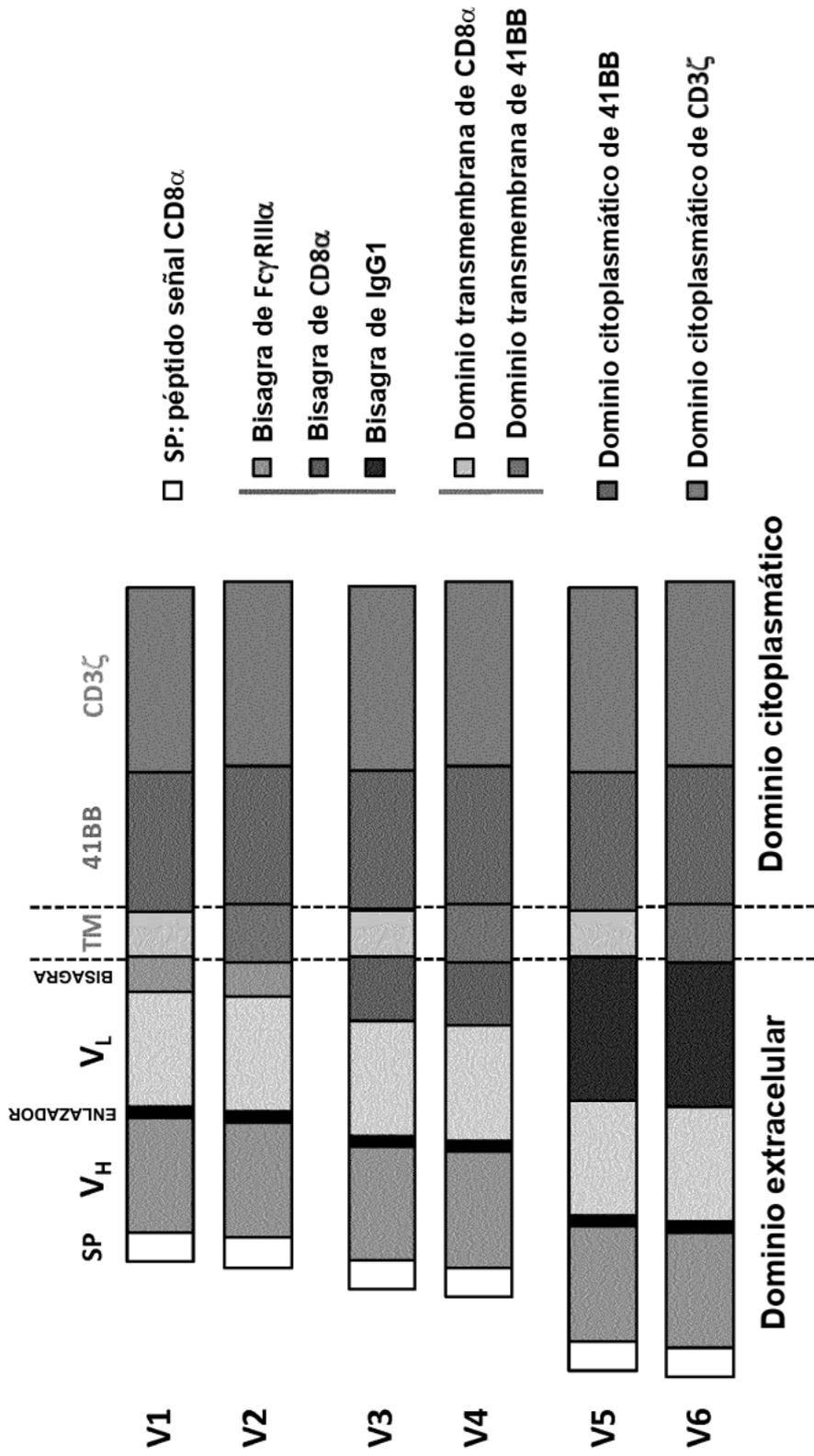
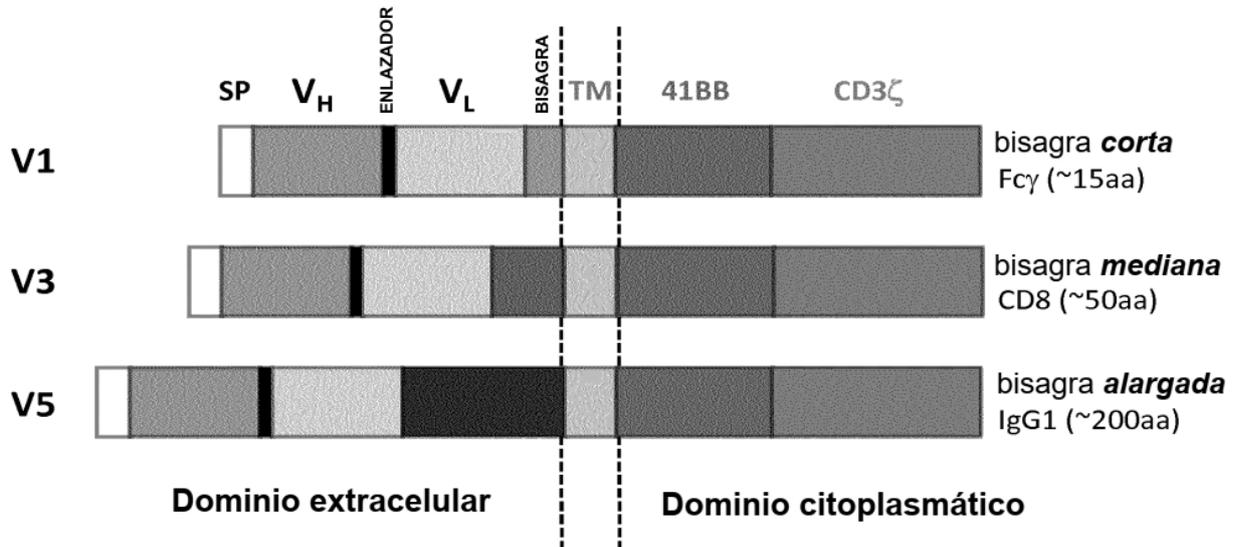


Figura 2

Arquitecturas CAR de CD123



- bisagra de FcγRIIIα
 - bisagra de CD8α
 - bisagra de IgG1
-
- dominio transmembrana de CD8α
 - dominio transmembrana de 41BB
-
- dominio citoplasmático de 41BB
 - dominio citoplasmático de CD3ζ

Figura 3

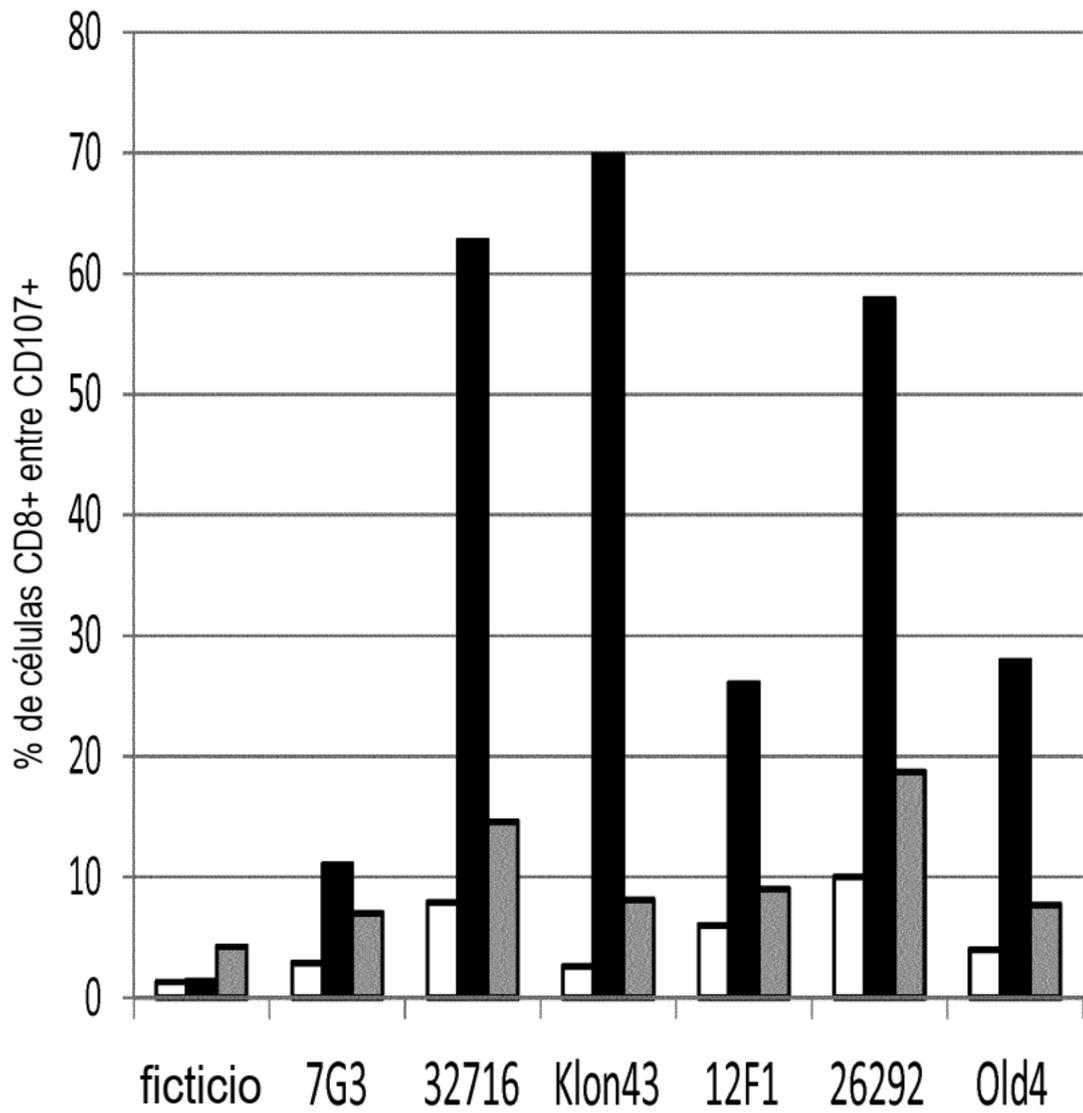


Figura 4

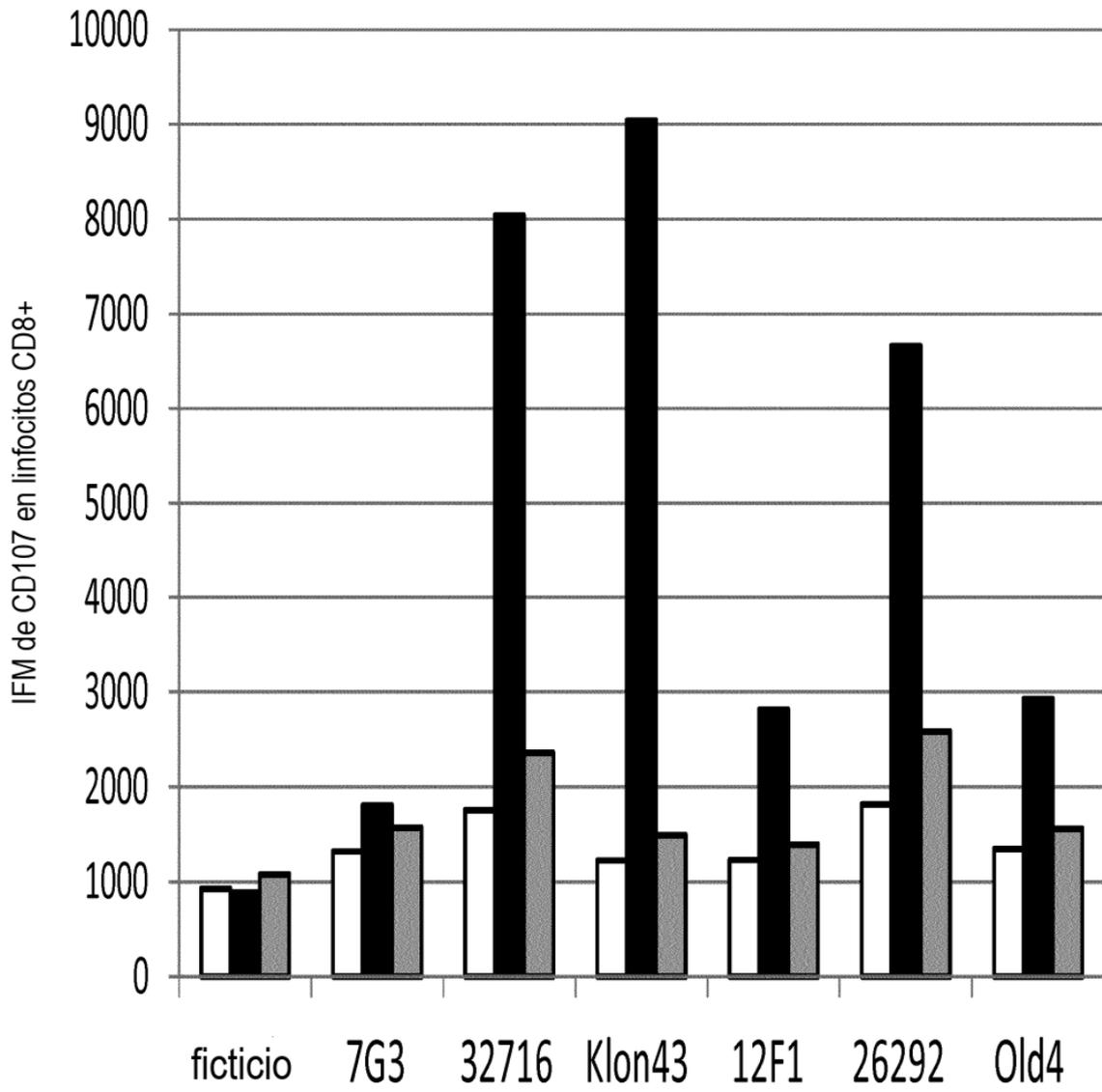


Figura 5

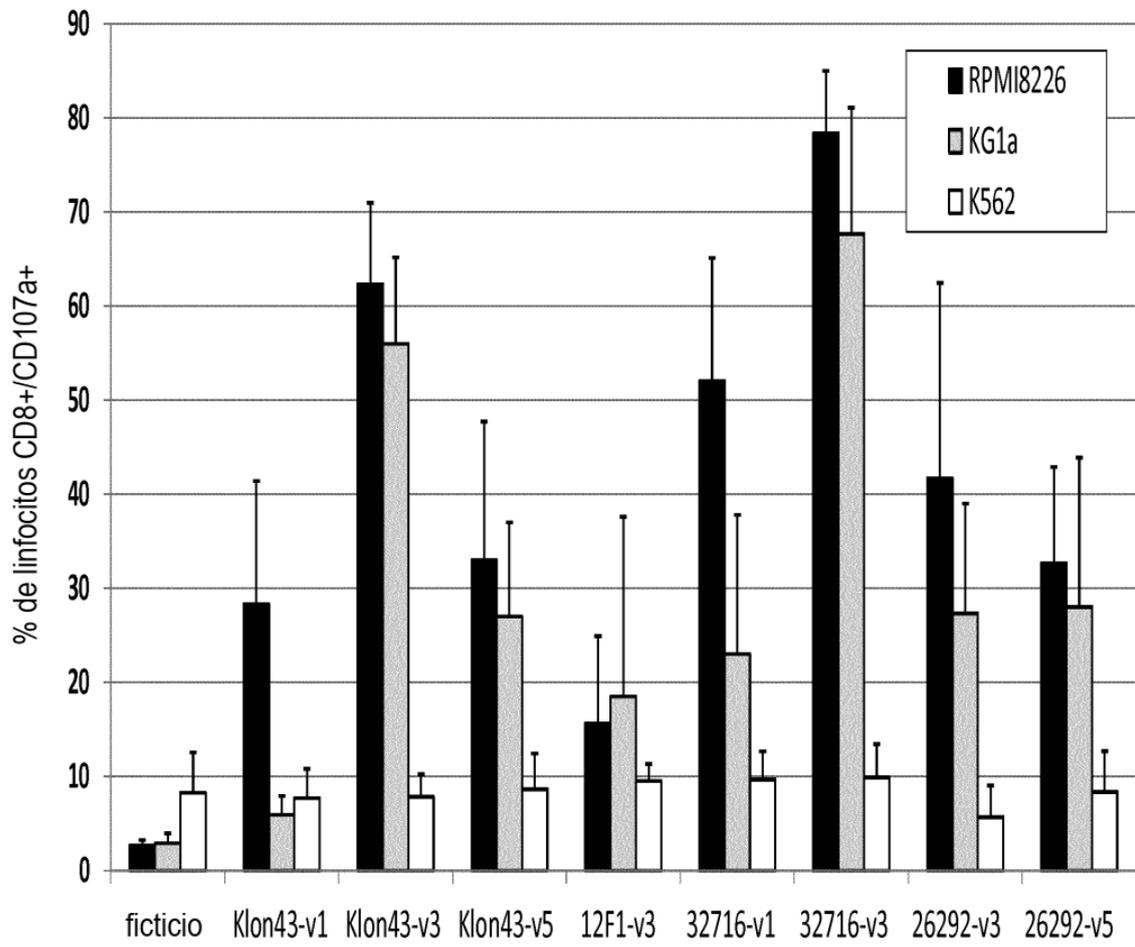


Figura 6

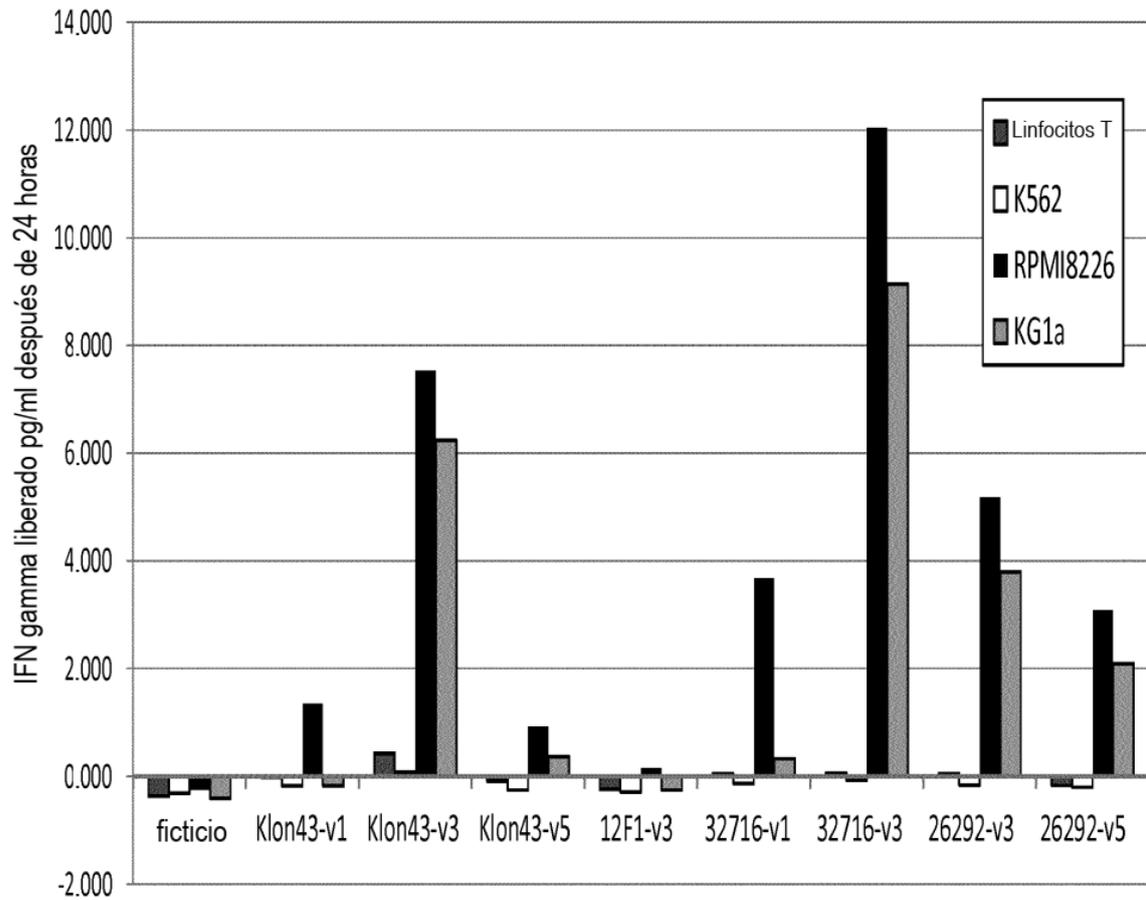


Figura 7

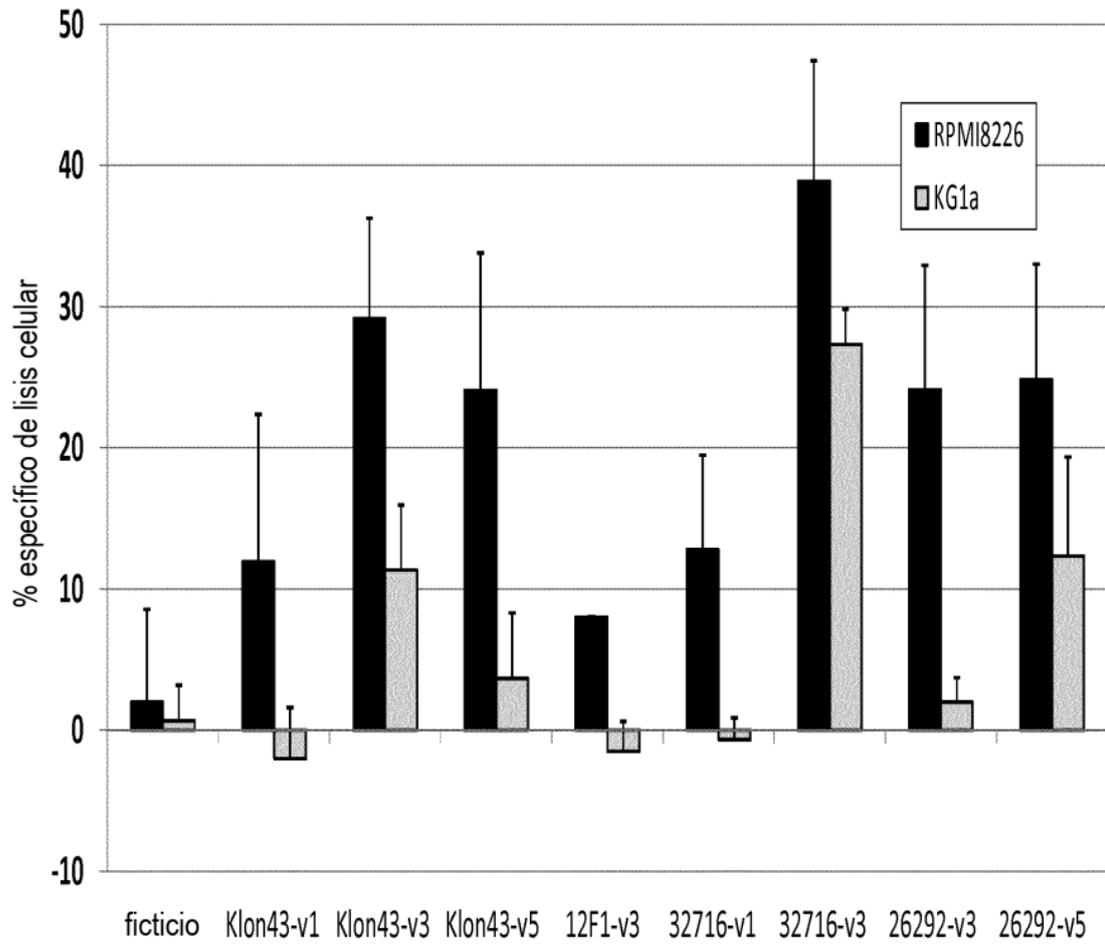
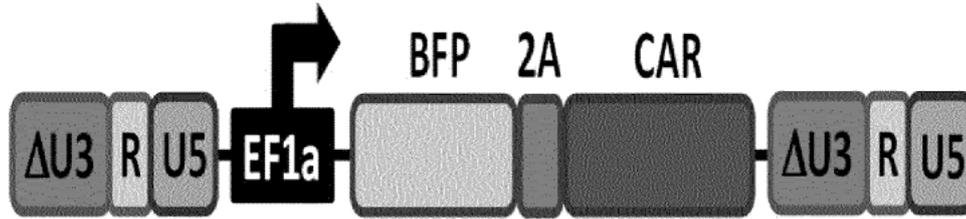


Figura 8



Día después de la TD	Klon43-v3		32716-v3	
	CAR	BFP	CAR	BFP
Donante 1, día 8	89 %	98 %	91 %	96 %
Donante 2, día 10	93 %	94 %	88 %	88 %

Figura 9

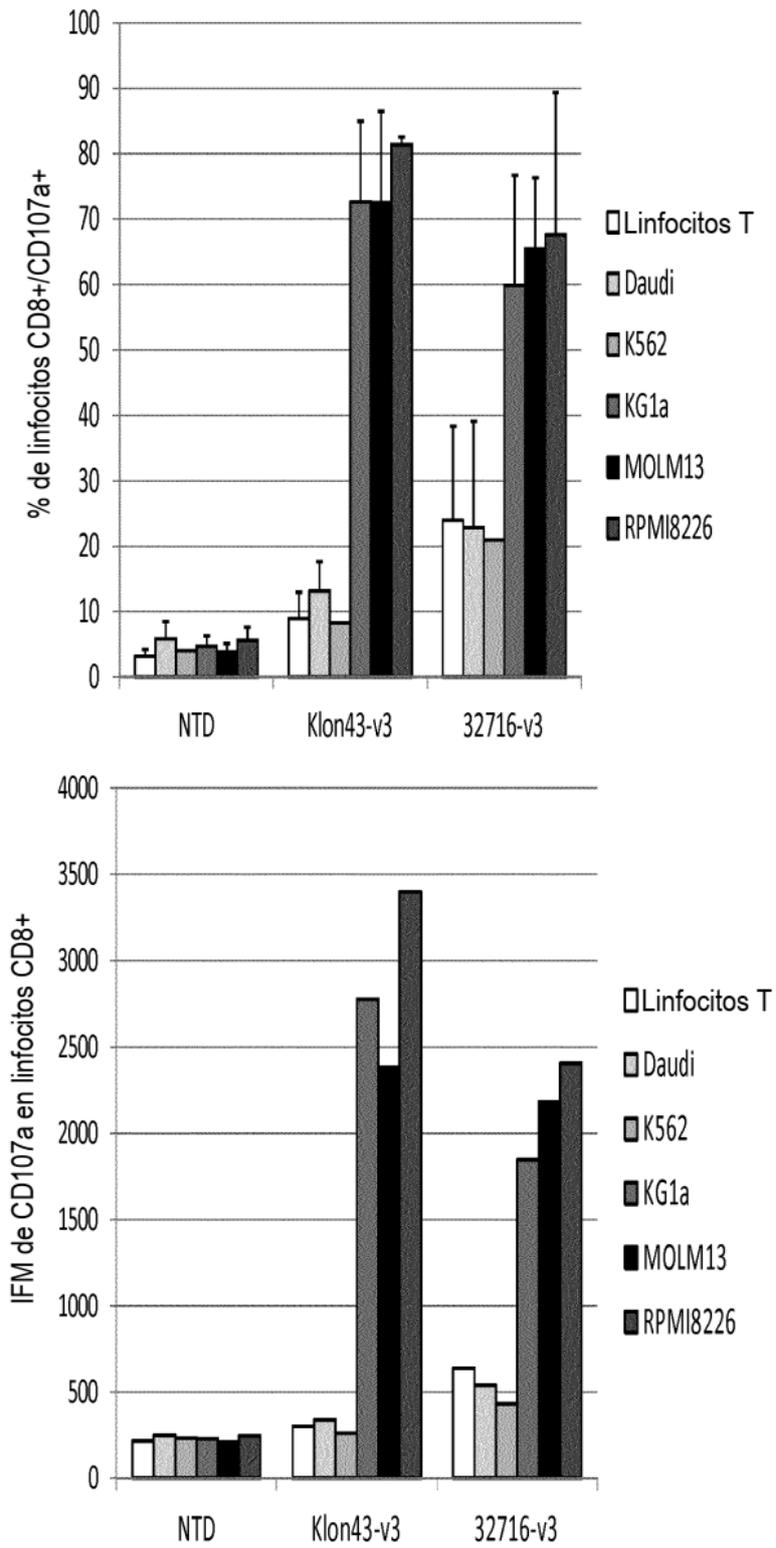


Figura 10

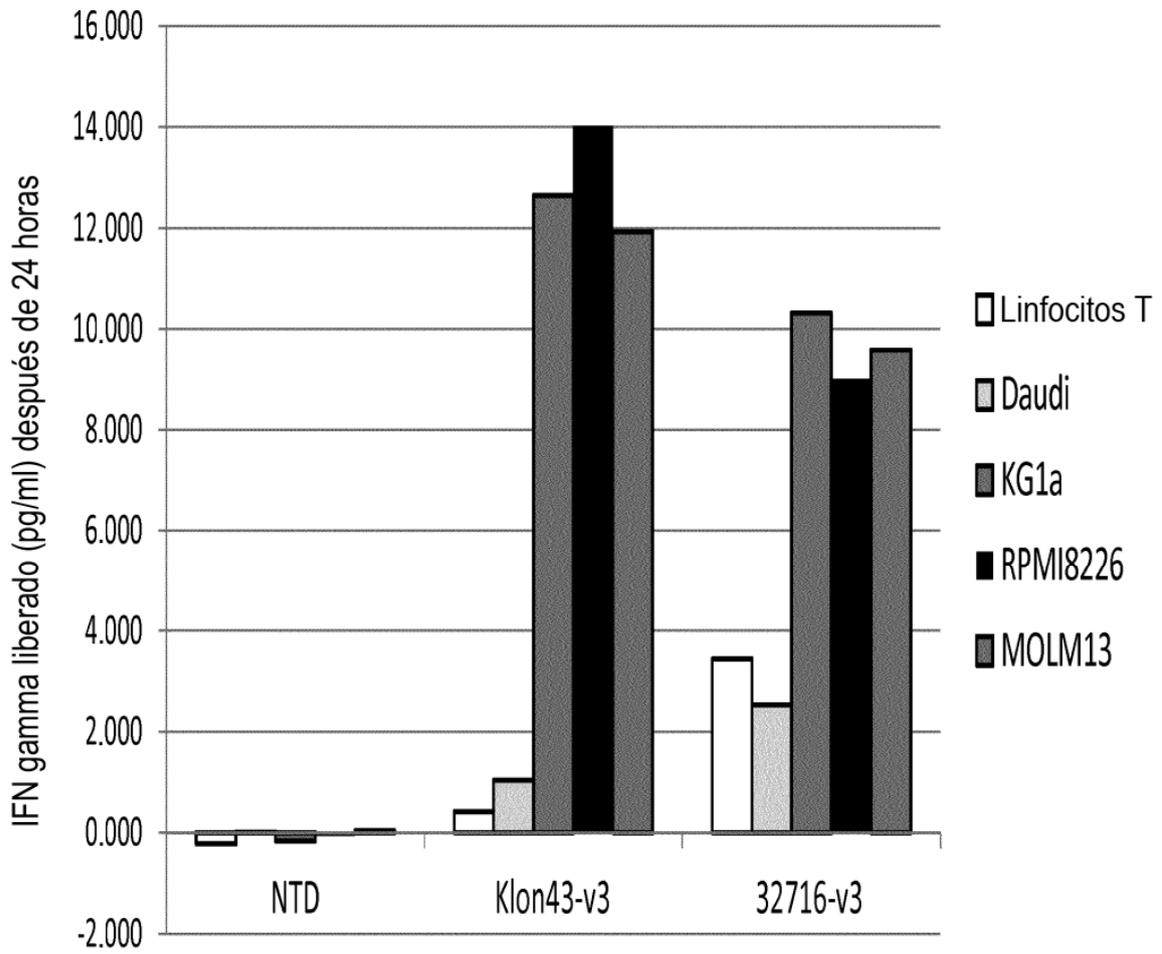


Figura 11

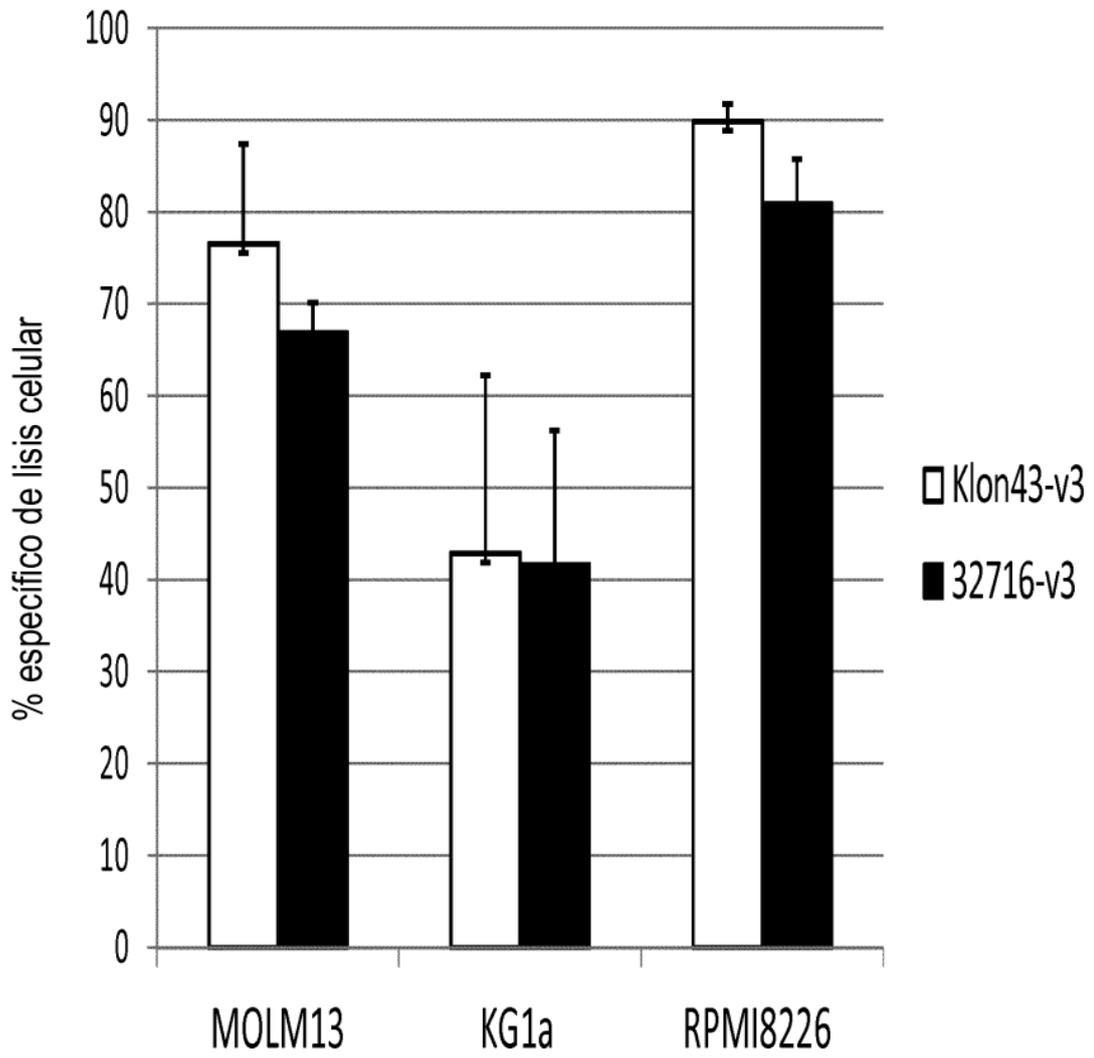


Figura 12

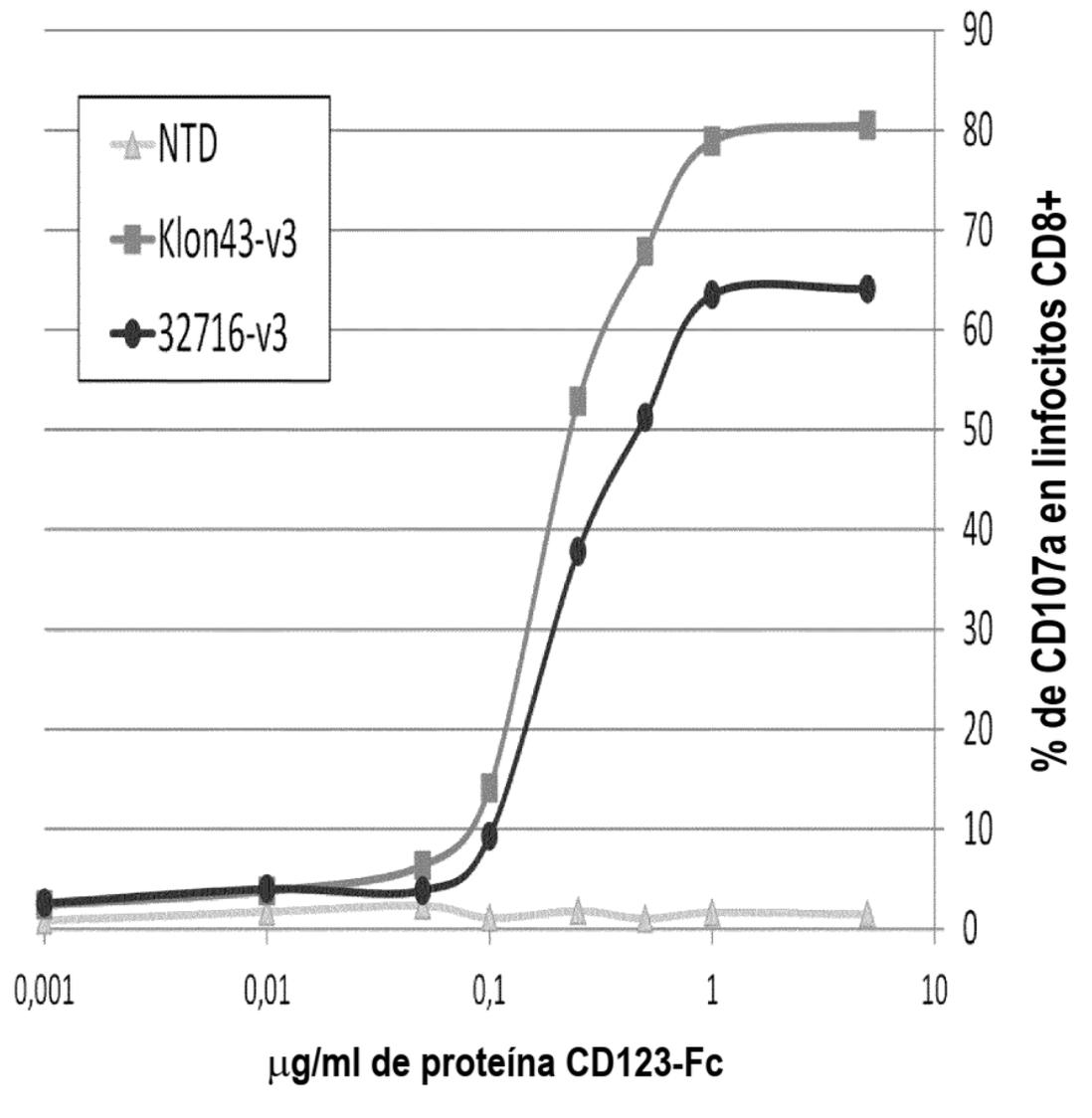


Figura 13

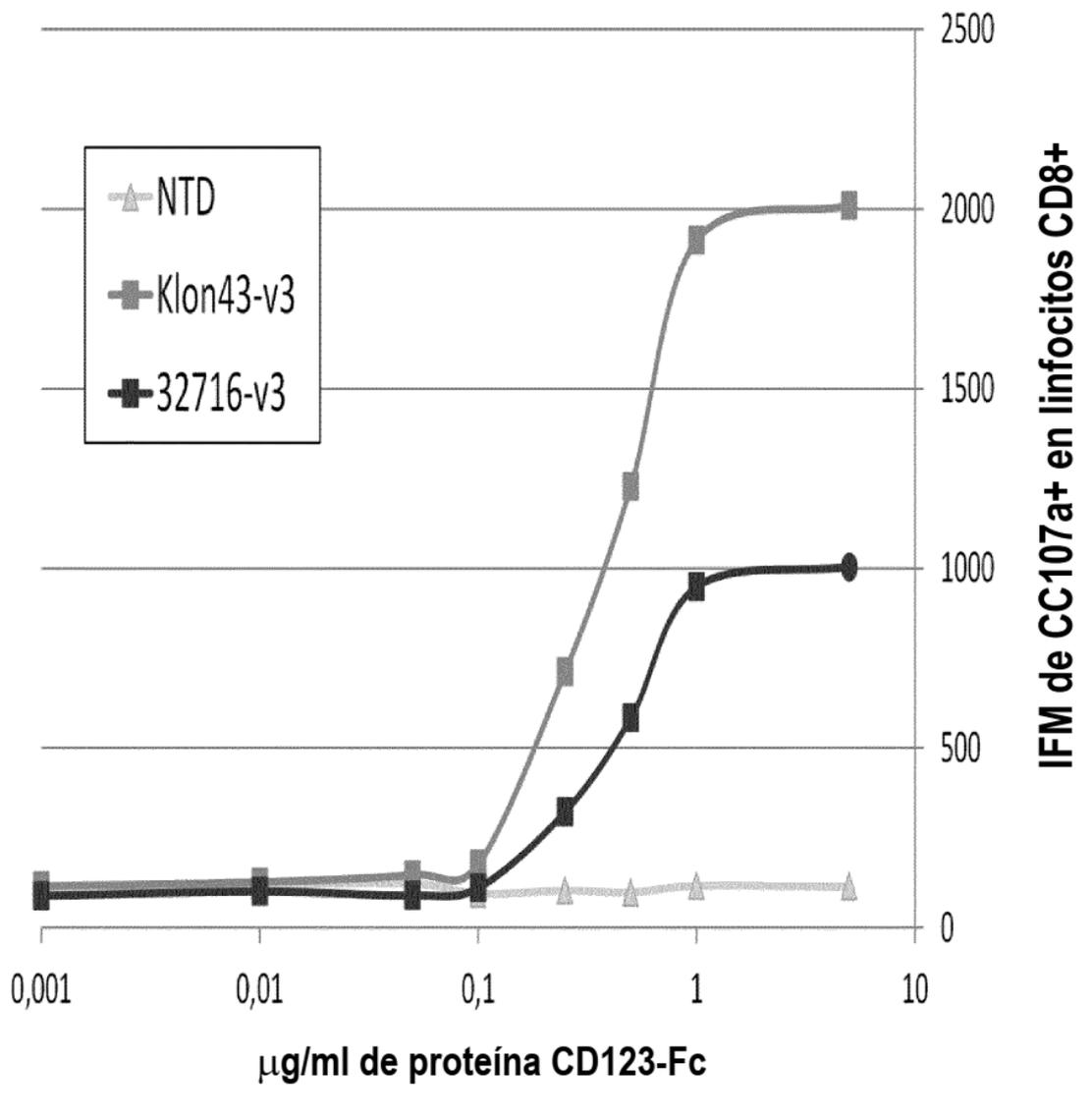


Figura 14

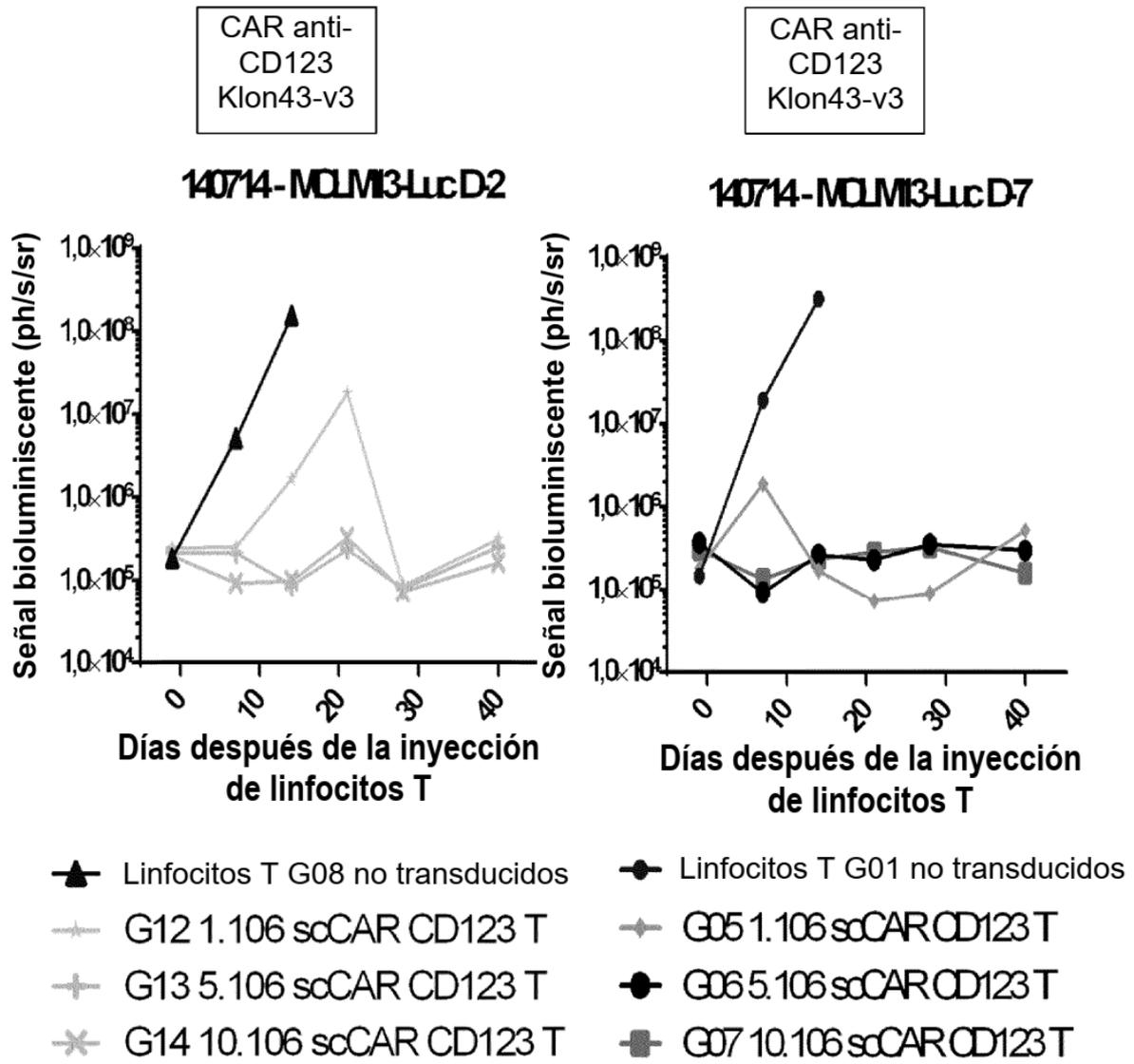


Figura 15