(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 743 232**

(51) Int. CI.:

C12N 15/62 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2015 PCT/US2015/065646**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2016 WO16100241**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2015 E 15823866 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019 EP 3234145**

(54) Título: **Métodos para la activación o eliminación controlada de células terapéuticas**

(30) Prioridad:

15.12.2014 US 201462092149 P
16.04.2015 US 201562148386 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.02.2020

(73) Titular/es:

BELLICUM PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
2130 West Holcombe Boulevard, Ste. 850
Houston, TX 77030, US

(72) Inventor/es:

SPENCER, DAVID, M.;
BAYLE, JOSEPH, HENRI;
FOSTER, AARON, EDWARD;
SLAWIN, KEVIN, M.;
MOSELEY, ANNEMARIE;
COLLINSON-PAUTZ, MATTHEW, R. y
DUONG, MYLINH

(74) Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

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

Métodos para la activación o eliminación controlada de células terapéuticas

Campo

La presente invención está definida por las reivindicaciones. La tecnología descrita en el presente documento se refiere en parte a métodos para controlar la actividad o eliminación de células terapéuticas usando multimerización de proteínas para manipular interacciones proteína-proteína individuales en células terapéuticas, por ejemplo, activando o eliminando células para promover el injerto, para tratar enfermedades o afecciones o para controlar o modular la actividad de células terapéuticas que expresan receptores de antígeno quiméricos o receptores de linfocitos T recombinantes.

Antecedentes

Hay un uso creciente de terapia celular en la que se administran células modificadas o no modificadas, tales como linfocitos T, a un paciente. En algunos ejemplos, las células se modifican por ingeniería genética para que expresen un gen heterólogo, administrándose después estas células modificadas a los pacientes. Pueden usarse genes heterólogos para expresar receptores de antígenos quiméricos (CAR), que son receptores artificiales diseñados para transmitir especificidad de antígeno a los linfocitos T sin la necesidad de presentación de antígenos del MHC. Incluyen un componente específico de antígeno, un componente transmembrana y un componente intracelular seleccionado para activar al linfocito T y proporcionar inmunidad específica. Los linfocitos T que expresan CAR pueden usarse en diversas terapias, incluyendo terapias para el cáncer. Estos tratamientos se usan, por ejemplo, para dirigirse a tumores para su eliminación y para tratar el cáncer y trastornos sanguíneos, pero estas terapias pueden tener efectos secundarios negativos.

En algunos casos de eventos adversos inducidos por las células terapéuticas, existe la necesidad de una eliminación rápida y prácticamente completa de las células terapéuticas. Los efectos excesivos en la diana, tales como aquellos dirigidos contra grandes masas tumorales, pueden provocar tormentas de citoquinas, asociadas con el síndrome de lisis tumoral (TLS), el síndrome de liberación de citoquinas (CRS) o el síndrome de activación de macrófagos (MAS). Como resultado, hay un gran interés en el desarrollo de un "gen de suicido" estable y fiable que pueda eliminar a los linfocitos T o las células madre transferidos en caso de que provoquen eventos adversos graves (SAE) o que queden obsoletos después del tratamiento. Sin embargo, en algunos casos, sigue necesitándose terapia y puede haber un modo de reducir los efectos negativos, a la vez que se mantiene un nivel suficiente de terapia.

En algunos casos, existe la necesidad de aumentar la actividad de la célula terapéutica. Por ejemplo, pueden usarse polipéptidos coestimulantes para potenciar la activación de linfocitos T y de linfocitos T que expresan CAR contra antígenos diana, que podrían aumentar la potencia de la inmunoterapia adoptiva.

Por lo tanto, existe la necesidad de la activación o eliminación controlada de células terapéuticas, para potenciar rápidamente la actividad o para eliminar los posibles efectos negativos de las células donantes usadas en la terapia celular, mientras que conservan una parte o la totalidad de los efectos beneficiosos de la terapia.

Sumario

Los linfocitos T autólogos que expresan receptores de antígeno quiméricos (CAR) dirigidos contra antígenos asociados a tumores (TAA) han tenido un efecto transformador en ensayos clínicos iniciales en el tratamiento de ciertos tipos de leucemias ("tumores líquidos") y linfomas con tasas de respuesta objetivas (OR) que se aproximan al 90 %. A pesar de su gran promesa clínica y del predecible entusiasmo que lo acompaña, este éxito se ve modulado por el alto nivel observado de eventos adversos en la diana y fuera del tumor, típicos de un síndrome de liberación de citoquinas (CRS). Para mantener el beneficio de estos tratamientos revolucionarios a la vez que se minimiza el riesgo, se ha desarrollado un interruptor de seguridad ajustable, para controlar el nivel de actividad de los linfocitos T que expresan CAR. Un polipéptido coestimulador inducible permite un control sostenido y modulado de un receptor de antígeno quimérico (CAR) que se coexpresa en la célula. El ligando inductor activa la célula que expresa CAR multimerizando las moléculas de señalización quiméricas inducibles, que, a su vez, induce a NF-κB y otras vías de señalización intracelular, que dan lugar a la activación de las células diana, por ejemplo, un linfocito T, un linfocito infiltrante en tumores (TIL), un linfocito citolítico natural (NK) o un linfocito T citolítico natural (NK-T). En ausencia del ligando inductor, el linfocito T permanece quiescente o tiene un nivel basal de actividad.

En el segundo nivel de control, un interruptor "regulador de la intensidad" puede permitir una terapia celular continuada, a la vez que se reducen o eliminan los efectos secundarios significativos eliminando las células terapéuticas del sujeto, según sea necesario. Este interruptor regulador de la intensidad depende de un segundo ligando inductor. En algunos ejemplos, cuando existe la necesidad de eliminar rápidamente las células terapéuticas, se administra una dosis adecuada del segundo ligando inductor para eliminar más de un 90 % o 95 % de las células terapéuticas del paciente. Este segundo nivel de control puede ser "ajustable", es decir, el nivel de eliminación de las células terapéuticas puede controlarse, de tal forma que da como resultado la eliminación parcial de las células terapéuticas. Este segundo nivel de control puede incluir, por ejemplo, un polipéptido proapoptótico quimérico.

En algunos ejemplos, el polipéptido proapoptótico quimérico comprende un sitio de unión para rapamicina o un análogo de rapamicina (rapálogo); en la célula terapéutica también hay presente un polipéptido quimérico inducible que, tras su inducción por un ligando inductor, activa a la célula terapéutica; en algunos ejemplos, el polipéptido quimérico inducible proporciona actividad coestimuladora a la célula terapéutica. El CAR puede estar presente en un polipéptido separado expresado en la célula. En otros ejemplos, el CAR puede estar presente como parte del mismo polipéptido como el polipéptido quimérico inducible. Usando este primer nivel controlable, la necesidad de una terapia continuada o la necesidad de estimular la terapia, puede equilibrarse con la necesidad de eliminar o reducir el nivel de efectos secundarios negativos.

Un análogo de rapamicina o "rapálogo", puede administrarse al paciente, el cual se une posteriormente al polipéptido de caspasa y al receptor de antígeno quimérico, reclutando de este modo el polipéptido de caspasa a la ubicación del CAR y agregando el polipéptido de caspasa. Tras la agregación, el polipéptido de caspasa induce la apoptosis. La cantidad de rapamicina o análogo de rapamicina administrada al paciente puede variar; en caso de que se desee un menor nivel de eliminación de células mediante apoptosis para reducir los efectos secundarios y continuar la terapia con CAR, puede administrarse un menor nivel de rapamicina o rapálogo al paciente.

Al segundo nivel de eliminación de células terapéuticas, puede inducirse apoptosis selectiva en células que expresan un polipéptido de Caspasa-9 fusionado al polipéptido de unión a ligando quimérico, tal como, por ejemplo, el polipéptido FKBP12v36 de unión a AP1903, mediante la administración de rimiducid (AP1903). En algunos ejemplos, el polipéptido de Caspasa-9 incluye sustituciones de aminoácidos que dan como resultado un menor nivel de actividad apoptótica basal como parte del polipéptido quimérico inducible, que el polipéptido de Caspasa-9 de tipo silvestre.

Por lo tanto, en el presente documento se describe un ácido nucleico que comprende un promotor, unido operativamente a a) un primer polinucleótido que codifica un primer polipéptido quimérico, en donde el primer polipéptido quimérico comprende (i) una primera región de multimerización o una segunda región de multimerización; (ii) una región de polipéptido MyD88 o una región de polipéptido MyD88 truncada que carece del dominio TIR; y (iii) una región de polipéptido citoplasmático CD40 que carece del dominio extracelular de CD40; y b) un segundo polinucleótido que codifica un segundo polipéptido quimérico, en donde el segundo polipéptido quimérico comprende (i) una región de polipéptido proapoptótico y (ii) la primera región de multimerización o la segunda región de multimerización, en donde: la segunda región de multimerización tiene una secuencia de aminoácidos diferente a la primera región de multimerización; el primer polipéptido quimérico comprende la primera región de multimerización y el segundo polipéptido quimérico comprende la segunda región de multimerización o el primer polipéptido quimérico comprende la segunda región de multimerización y el segundo polipéptido quimérico comprende la primera región de multimerización; la primera región de multimerización y la segunda región de multimerización se unen a un primer ligando; la primera región de multimerización se une a un segundo ligando; y el segundo ligando no se une significativamente a la segunda región de multimerización. En el presente documento también se proporcionan ácidos nucleicos que comprenden un promotor, unido operativamente a a) un primer polinucleótido que codifica un primer polipéptido quimérico, en donde el primer polipéptido quimérico comprende (i) una primera región de multimerización o una segunda región de multimerización; y (ii) una región de polipéptido MyD88 o una región de polipéptido MyD88 truncada que carece del dominio TIR; y b) un segundo polinucleótido que codifica un segundo polipéptido quimérico, en donde el segundo polipéptido quimérico comprende (i) una región de polipéptido proapoptótico y (ii) la primera región de multimerización o la segunda región de multimerización, en donde la segunda región de multimerización tiene una secuencia de aminoácidos diferente a la primera región de multimerización; el primer polipéptido quimérico comprende la primera región de multimerización y el segundo polipéptido quimérico comprende la segunda región de multimerización o el primer polipéptido quimérico comprende la segunda región de multimerización y el segundo polipéptido quimérico comprende la primera región de multimerización; la primera región de multimerización y la segunda región de multimerización se unen a un primer ligando; la primera región de multimerización se une a un segundo ligando; y el segundo ligando no se une significativamente a la segunda región de multimerización.

El primer ligando puede comprender una primera porción, la primera región de multimerización se une a la primera porción y la segunda región de multimerización no se une significativamente a la primera porción. El segundo ligando puede no ser capaz de unirse a la segunda región de multimerización. La primera región de multimerización puede ser una región FKBP12 o FKBP12 variante y la segunda región de multimerización es una región de unión a FKBP-12-rapamicina (FRB) o FRB variante. El primer ligando puede ser rapamicina o un rapálogo y el segundo ligando puede seleccionarse entre el grupo que consiste en AP1903, AP20187 y AP1510.

En el presente documento también se describen ácidos nucleicos que comprenden un promotor, unido operativamente a a) un primer polinucleótido que codifica un primer polipéptido quimérico, en donde el primer polipéptido quimérico comprende (i) una región FKBP12 o FKBP12 variante; (ii) una región de polipéptido MyD88 o una región de polipéptido MyD88 truncada que carece del dominio TIR; y (iii) una región de polipéptido citoplasmático CD40 que carece del dominio extracelular de CD40; y b) un segundo polinucleótido que codifica un segundo polipéptido quimérico, en donde el segundo polipéptido quimérico comprende una región de Caspasa-9 y una región FRB o FRB variante. En el presente documento también se describe un ácido nucleico que comprende un promotor, unido operativamente a a) un primer polinucleótido que codifica un primer polipéptido quimérico, en

donde el primer polipéptido quimérico comprende (i) al menos dos regiones FKBP12 o FKBP12 variantes; (ii) una región de polipéptido MyD88 o una región de polipéptido MyD88 truncada que carece del dominio TIR; y (iii) una región de polipéptido citoplasmático CD40 que carece del dominio extracelular de CD40; y b) un segundo polinucleótido que codifica un segundo polipéptido quimérico, en donde el segundo polipéptido quimérico comprende una región de Caspasa-9 y una región FRB o FRB variante.

También se describe una célula modificada que se transduce o transfecta con un ácido nucleico de la presente solicitud. También se describen células modificadas que comprenden a) un primer polinucleótido que codifica un primer polipéptido quimérico, en donde el primer polipéptido quimérico comprende (i) una primera región de multimerización o una segunda región de multimerización; (ii) una región de polipéptido MyD88 o una región de polipéptido MyD88 truncada que carece del dominio TIR; y (iii) una región de polipéptido citoplasmático CD40 que carece del dominio extracelular de CD40; y b) un segundo polinucleótido que codifica un segundo polipéptido quimérico, en donde el segundo polipéptido quimérico comprende (i) una región de polipéptido proapoptótico y (ii) la primera región de multimerización o la segunda región de multimerización, en donde: la segunda región de multimerización tiene una secuencia de aminoácidos diferente a la primera región de multimerización; el primer polipéptido quimérico comprende la primera región de multimerización y el segundo polipéptido quimérico comprende la segunda región de multimerización o el primer polipéptido quimérico comprende la segunda región de multimerización y el segundo polipéptido quimérico comprende la primera región de multimerización; la primera región de multimerización y la segunda región de multimerización se unen a un primer ligando; la primera región de multimerización se une a un segundo ligando; y el segundo ligando no se une significativamente a la segunda región de multimerización. El segundo ligando puede no ser capaz de unirse a la segunda región de multimerización.

En el presente documento también se describen métodos para controlar la supervivencia de células modificadas trasplantadas en un sujeto, que comprende a) trasplantar células modificadas de la presente solicitud en el sujeto; y b) después de (a), administrar al sujeto el primer ligando en una cantidad eficaz para eliminar menos de un 30 % o al menos un 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 95 % de las células modificadas que expresan el segundo polipéptido quimérico, en donde el primer polipéptido quimérico comprende la primera región de multimerización y el segundo polipéptido quimérico comprende la segunda región de multimerización.

Asimismo, en el presente documento se describen métodos para tratar a un sujeto que tiene una enfermedad o afección asociada con una expresión elevada de un antígeno diana expresado por una célula diana, que comprende (a) trasplantar una cantidad eficaz de células modificadas en el sujeto; en donde las células modificadas comprenden una célula modificada de la presente solicitud, en donde la célula modificada comprende un receptor de antígeno quimérico que comprende un motivo de reconocimiento de antígeno que se une al antígeno diana y (b) después de a), administrar una cantidad eficaz del segundo ligando para reducir el número o la concentración del antígeno diana o las células diana en el sujeto, en donde el primer polipéptido quimérico comprende la primera región de multimerización y el segundo polipéptido quimérico comprende la segunda región de multimerización. Los métodos pueden comprender después de b), administrar el primer ligando en una cantidad eficaz para eliminar a menos de un 30 % o al menos un 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 95 % de las células modificadas que expresan el segundo polipéptido quimérico.

La primera región de multimerización puede comprender dos regiones FKBP12v36 y la segunda región de multimerización comprende una región FRB o FRB variante. El polipéptido proapoptótico puede ser un polipéptido de caspasa.

En el presente documento también se describen ácidos nucleicos que comprenden un promotor, unido operativamente a un primer polinucleótido y un segundo polinucleótido, en donde a) el primer polinucleótido codifica un primer polipéptido apoptótico quimérico que comprende una primera región de multimerización y una región de polipéptido proapoptótico; y b) el segundo polinucleótido codifica un segundo polipéptido apoptótico quimérico que comprende una segunda región de multimerización y una región de polipéptido proapoptótico, en donde la segunda región de multimerización tiene una secuencia de aminoácidos diferente a la primera región de multimerización; en donde las regiones de multimerización primera y segunda se unen a un primer ligando y las regiones de polipéptido proapoptótico son conjuntamente capaces de multimerizarse después de la unión al primer ligando y de inducir apoptosis en una célula. La primera región de multimerización puede unirse a un segundo ligando y no se une significativamente a la segunda región de multimerización. El segundo ligando puede no ser capaz de unirse a la segunda región de multimerización. El polipéptido proapoptótico puede ser un polipéptido de caspasa.

El presente documento también se describen ácidos nucleicos que comprenden un promotor unido operativamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una región FRB o FRB variante y una región de polipéptido de caspasa. También se describen ácidos nucleicos que comprenden un promotor, unido operativamente a un primer polinucleótido y un segundo polinucleótido, en donde a) el primer polinucleótido codifica un primer polipéptido de caspasa quimérico que comprende una región FRB o FRB variante y una región de polipéptido de caspasa; y b) el segundo polinucleótido codifica un segundo polipéptido de caspasa quimérico que comprende una región FKBP12 o FKBP12 variante y una región de polipéptido de caspasa.

En el presente documento también se describen células modificadas que se transfectan o transducen con un ácido

nucleico de la presente solicitud. En el presente documento también se describen células modificadas, que comprenden a) un primer polinucleótido que codifica un primer polipéptido apoptótico quimérico que comprende una primera región de multimerización y una región de polipéptido proapoptótico y una segunda región de multimerización; y b) un segundo polinucleótido que codifica un segundo polipéptido apoptótico quimérico que comprende una segunda región de multimerización y una región de polipéptido proapoptótico, en donde la segunda región de multimerización tiene una secuencia de aminoácidos diferente a la primera región de multimerización; en donde las regiones de multimerización primera y segunda se unen a un primer ligando y las regiones de polipéptido proapoptótico son conjuntamente capaces de multimerizarse después de la unión al primer ligando y de inducir apoptosis en la célula. La primera región de multimerización puede unirse a un segundo ligando y no se une significativamente a la segunda región de multimerización.

En el presente documento también se describe un ácido nucleico que comprende un promotor, unido operativamente a un polinucleótido que codifica un primer polipéptido, en donde el primer polipéptido comprende una región de armazón que comprende al menos dos regiones de multimerización o al menos dos segundas regiones de multimerización, en donde cada una de las primeras regiones de multimerización es diferente de cada una de las segundas regiones de multimerización. El ácido nucleico puede comprender además un segundo polinucleótido que codifica un segundo polipéptido quimérico, en donde el segundo polipéptido quimérico comprende una región de polipéptido proapoptótico y la primera región de multimerización o la segunda región de multimerización, en donde la segunda región de multimerización tiene una secuencia de aminoácidos diferente a la primera región de multimerización; en donde: la primera región de multimerización y la segunda región de multimerización se unen a un primer ligando; y el primer polipéptido comprende la primera región de multimerización y el segundo polipéptido quimérico comprende la segunda región de multimerización o el primer polipéptido comprende la segunda región de multimerización y el segundo polipéptido quimérico comprende la primera región de multimerización. El primer ligando puede comprender una primera porción, la primera región de multimerización se une a la primera porción y la segunda región de multimerización no se une significativamente a la primera porción. La segunda región de multimerización puede unirse a un segundo ligando y la primera región de multimerización puede no unirse significativamente a la primera región de multimerización.

En el presente documento también se describen células modificadas que comprenden un polinucleótido que codifica un primer polipéptido, en donde el primer polipéptido comprende una región de armazón que comprende al menos dos regiones de multimerización o al menos dos segundas regiones de multimerización, en donde cada una de las primeras regiones de multimerización es diferente de cada una de las segundas regiones de multimerización. La célula modificada puede comprender además un segundo polinucleótido que codifica un segundo polipéptido quimérico, en donde el segundo polipéptido quimérico comprende una región de polipéptido proapoptótico y la primera región de multimerización o la segunda región de multimerización, en donde la segunda región de multimerización tiene una secuencia de aminoácidos diferente a la primera región de multimerización; en donde: la primera región de multimerización y la segunda región de multimerización se unen a un primer ligando; y el primer polipéptido comprende la primera región de multimerización y el segundo polipéptido quimérico comprende la segunda región de multimerización o el primer polipéptido comprende la segunda región de multimerización y el segundo polipéptido quimérico comprende la primera región de multimerización.

También se describen en el presente documento células modificadas que comprenden un primer polinucleótido que codifica un polipéptido de armazón, en donde el polipéptido de armazón comprende al menos dos regiones FRB o FRB variantes y un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido quimérico que comprende una región FKBP12 o FKBP12 variante y un polipéptido de Caspasa-9. También se describen en el presente documento células modificadas que comprenden un primer polinucleótido que codifica un polipéptido de armazón, en donde el polipéptido de armazón comprende al menos dos regiones FKBP12 o FKBP12 variantes y un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido quimérico que comprende un FRB o FRB variante y un polipéptido de Caspasa-9. Las células modificadas pueden comprender además un receptor de antígeno quimérico o un receptor de linfocitos T quimérico.

En el presente documento también se describen métodos para controlar la supervivencia de células modificadas trasplantadas en un sujeto, que comprende: a) trasplantar células modificadas de la presente solicitud al sujeto; y b) después de (a), administrar al sujeto rapamicina o un rapálogo, en una cantidad eficaz para eliminar a menos de un 30 % o al menos un 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 95 % de las células modificadas que expresan el segundo polipéptido quimérico que comprende la región de polipéptido proapoptótico. La segunda región de multimerización puede ser una región FKBP12 o FKBP12 variante, que además comprende administrar un ligando que se une a la región FKBP12 o FKBP12 variante en el segundo polipéptido quimérico que comprende la región de polipéptido proapoptótico en una cantidad eficaz para eliminar al menos un 90 % de las células modificadas que expresan el segundo polipéptido quimérico. Asimismo, en el presente documento se describen métodos para tratar a un sujeto que tiene una enfermedad o afección asociada con una expresión elevada de un antígeno diana expresado por una célula diana, que comprenden (a) administrar al sujeto una cantidad eficaz de una célula modificada de la presente solicitud, en donde la célula modificada comprende además un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico o un receptor de linfocitos T que se une al antígeno diana; y (b) después de a), administrar una cantidad eficaz de un ligando, rapamicina o un rapálogo.

En el presente documento también se describe un ácido nucleico que comprende un promotor, unido operativamente a

a) un primer polinucleótido que codifica un primer polipéptido quimérico, en donde el primer polipéptido quimérico comprende (i) dos regiones FKBP12v36; (ii) una región de polipéptido MyD88 truncada que carece del dominio TIR; y (iii) una región de polipéptido citoplasmático CD40 que carece del dominio extracelular de CD40;
b) un segundo polinucleótido que codifica un segundo polipéptido quimérico, en donde el segundo polipéptido quimérico comprende una región de Caspasa-9 y un FRB_L; y
c) un tercer polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende una región transmembrana, una molécula de activación de linfocitos T y un motivo de reconocimiento de antígeno seleccionado entre el grupo que consiste en Her2/Neu, PSCA y CD19.

En el presente documento también se describe una célula modificada que comprende a) un primer polinucleótido que codifica un primer polipéptido quimérico, en donde el primer polipéptido quimérico comprende (i) dos regiones FKBP12v36; (ii) una región de polipéptido MyD88 truncada que carece del dominio TIR; y (iii) una región de polipéptido citoplasmático CD40 que carece del dominio extracelular de CD40; b) un segundo polinucleótido que codifica un segundo polipéptido quimérico, en donde el segundo polipéptido quimérico comprende una región de Caspasa-9 y un FRB_L; y c) un tercer polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende una región transmembrana, una molécula de activación de linfocitos T y un motivo de reconocimiento de antígeno Her2/Neu.

En el presente documento también se describe un ácido nucleico que comprende un promotor, unido operativamente a

a) un primer polinucleótido que codifica un primer polipéptido quimérico, en donde el primer polipéptido quimérico comprende (i) dos regiones FKBP12v36; (ii) una región de polipéptido MyD88 truncada que carece del dominio TIR; y (iii) una región de polipéptido citoplasmático CD40 que carece del dominio extracelular de CD40;
b) un segundo polinucleótido que codifica un segundo polipéptido quimérico, en donde el segundo polipéptido quimérico comprende una región de Caspasa-9 y un FRB_L; y
c) un tercer polinucleótido que codifica un receptor de linfocitos T quimérico. En el presente documento también se describe una célula modificada que comprende a) un primer polinucleótido que codifica un primer polipéptido quimérico, en donde el primer polipéptido quimérico comprende (i) dos regiones FKBP12v36; (ii) una región de polipéptido MyD88 truncada que carece del dominio TIR; y (iii) una región de polipéptido citoplasmático CD40 que carece del dominio extracelular de CD40; b) un segundo polinucleótido que codifica un segundo polipéptido quimérico, en donde el segundo polipéptido quimérico comprende una región de Caspasa-9 y un FRB_L; y c) un tercer polinucleótido que codifica un receptor de linfocitos T quimérico.

En el presente documento también se describe un ácido nucleico que comprende un promotor unido operativamente a un primer polinucleótido que codifica un primer polipéptido quimérico, en donde el primer polipéptido quimérico comprende (i) una primera región de unión a ligando; (ii) una región de polipéptido MyD88 o una región de polipéptido MyD88 truncada que carece del dominio TIR; y (iii) una región de polipéptido citoplasmático CD40 que carece del dominio extracelular de CD40; y un segundo polinucleótido que codifica un segundo polipéptido quimérico, en donde el segundo polipéptido quimérico comprende una región de polipéptido proapoptótico y una segunda región de unión a ligando, en donde la segunda región de unión a ligando tiene una secuencia de aminoácidos diferente a la segunda región de unión a ligando; en donde las regiones de unión a ligando primera y segunda son capaces de unirse a un primer ligando multimérico; siendo capaz la primera región de unión de unirse a un segundo ligando; y el segundo ligando no se une significativamente a la segunda región de unión a ligando. En el presente documento también se describe un ácido nucleico que comprende un promotor, unido operativamente a un primer polinucleótido que codifica un primer polipéptido quimérico, en donde el primer polipéptido quimérico comprende (i) una primera región de unión a ligando; y (ii) una región de polipéptido MyD88 o una región de polipéptido MyD88 truncada que carece del dominio TIR; y un segundo polinucleótido que codifica un segundo polipéptido quimérico, en donde el segundo polipéptido quimérico comprende una región de polipéptido proapoptótico y una segunda región de unión a ligando, en donde la segunda región de unión a ligando tiene una secuencia de aminoácidos diferente a la segunda región de unión a ligando; en donde las regiones de unión a ligando primera y segunda son capaces de unirse a un primer ligando; siendo capaz la primera región de unión de unirse a un segundo ligando; y el segundo ligando no se une significativamente a la segunda región de unión a ligando. El ácido nucleico puede comprender además un polinucleótido que codifica un polipéptido enlazador entre los polinucleótidos primero y segundo, en donde el polipéptido enlazador separa los productos de traducción de los polinucleótidos primero y segundo durante o después de la traducción, por ejemplo, el polipéptido enlazador puede ser un polipéptido 2A. El segundo ligando puede no ser capaz de unirse a la segunda región de unión a ligando.

El ácido nucleico puede comprender además un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico, un receptor de linfocitos T o un receptor de antígeno quimérico a base de receptor de linfocitos T. El receptor de antígeno quimérico puede comprender (i) una región transmembrana, (ii) una molécula de activación de linfocitos T y (iii) un motivo de reconocimiento de antígeno.

También se proporcionan células modificadas transfectadas o transducidas con un ácido nucleico analizado en el presente documento. En el presente documento también se describen células modificadas que comprenden un primer polinucleótido que codifica un primer polipéptido quimérico, en donde el primer polipéptido quimérico comprende (i) una primera región de unión a ligando; (ii) una región de polipéptido MyD88 o una región de polipéptido MyD88 truncada que carece del dominio TIR; y (iii) una región de polipéptido citoplasmático CD40 que carece del dominio extracelular de CD40; y un segundo polinucleótido que codifica un segundo polipéptido quimérico, en donde el segundo polipéptido quimérico comprende una región de polipéptido proapoptótico y una segunda región de unión a ligando, en donde la segunda región de unión a ligando tiene una secuencia de aminoácidos diferente a la segunda región de unión a ligando; en donde las regiones de unión a ligando primera y segunda son capaces de unirse a un primer ligando; siendo capaz la primera región de unión de unirse a un segundo ligando; y el segundo ligando no se une significativamente a la segunda región de unión a ligando. En el presente documento también se describen células modificadas que comprenden un primer polinucleótido que codifica un primer polipéptido quimérico, en donde el primer polipéptido quimérico comprende (i) una primera región de unión a ligando; y (ii) una región de polipéptido MyD88 o una región de polipéptido MyD88 truncada que carece del dominio TIR; y un segundo polinucleótido que codifica un segundo polipéptido quimérico, en donde el segundo polipéptido quimérico comprende una región de polipéptido proapoptótico y una segunda región de unión a ligando, en donde la segunda región de unión a ligando tiene una secuencia de aminoácidos diferente a la segunda región de unión a ligando; en donde las regiones de unión a ligando primera y segunda son capaces de unirse a un primer ligando; siendo capaz la primera región de unión de unirse a un segundo ligando; y el segundo ligando no se une significativamente a la segunda región de unión a ligando. El segundo ligando puede no ser capaz de unirse a la segunda región de unión a ligando. La célula modificada puede comprender además un tercer polinucleótido que codifica un polipéptido marcador. El primer polipéptido quimérico comprende además un polipéptido marcador. El segundo polipéptido quimérico puede comprender además un polipéptido marcador.

La célula modificada puede comprender además un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico, un receptor de linfocitos T o un receptor de antígeno quimérico a base de receptor de linfocitos T. El receptor de antígeno quimérico puede comprender (i) una región transmembrana, (ii) una molécula de activación de linfocitos T y (iii) un motivo de reconocimiento de antígeno.

En el presente documento también se describen métodos para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende: trasplantar células modificadas analizadas en el presente documento al sujeto; y después administrar una cantidad eficaz del segundo ligando para estimular una respuesta inmunitaria mediada por células. En el presente documento también se describen métodos para administrar un ligando a un sujeto humano que se ha sometido a terapia celular usando células modificadas analizadas en el presente documento, que comprenden administrar el segundo ligando al sujeto humano. En el presente documento también se describen métodos para controlar la actividad de células modificadas trasplantadas en un sujeto, que comprende: trasplantar células modificadas analizadas en el presente documento al sujeto; y después administrar una cantidad eficaz del segundo ligando para estimular la actividad de las células modificadas trasplantadas. Los métodos pueden comprender además administrar posteriormente al sujeto el primer ligando en una cantidad eficaz para eliminar menos de un 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 % de las células modificadas que expresan el segundo polipéptido quimérico.

Asimismo, en el presente documento se describen métodos para tratar a un sujeto que tiene una enfermedad o afección asociada con una expresión elevada de un antígeno diana expresado por una célula diana, que comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de una célula modificada de uno cualquiera de los puntos B1-D14, en donde la célula comprende un receptor de antígeno quimérico que comprende un motivo de reconocimiento de antígeno que se une al antígeno diana y después administrar una cantidad eficaz del segundo ligando para reducir el número o la concentración de antígeno diana o células diana en el sujeto.

En el presente documento también se describen métodos para reducir el tamaño de un tumor en un sujeto, que comprenden administrar células modificadas analizadas en el presente documento al sujeto, en donde la célula comprende un receptor de antígeno quimérico que comprende un motivo de reconocimiento de antígeno que se une a un antígeno en el tumor; y después administrar una cantidad eficaz del segundo ligando para reducir el tamaño del tumor en el sujeto.

En el presente documento también se describe una célula modificada que comprende un primer polinucleótido que codifica un primer polipéptido quimérico, en donde el primer polipéptido quimérico comprende una región de polipéptido de direccionamiento a membrana y una primera región de unión a ligando; y un segundo polinucleótido que codifica un segundo polipéptido quimérico, en donde el segundo polipéptido quimérico comprende una región de polipéptido proapoptótico y una segunda región de unión a ligando, en donde la segunda región de unión a ligando tiene una secuencia de aminoácidos diferente a la segunda región de unión a ligando; en donde las regiones de unión a ligando primera y segunda son capaces de unirse a un primer ligando multimérico.

En el presente documento también se describe una célula modificada que comprende un primer polinucleótido que codifica un CAR, en donde el CAR comprende un dominio de unión a FKBP12-rapamicina (FRB); y un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido de caspasa quimérico, en donde el polipéptido de caspasa quimérico comprende (i) una región de multimerización de FKBP y (ii) un polipéptido de caspasa. En el presente documento

también se describe una célula modificada, que comprende un primer polinucleótido que codifica un CAR, en donde el CAR comprende (i) una región transmembrana, (ii) una molécula de activación de linfocitos T, (ii) un motivo de reconocimiento de antígeno y (iv) un dominio de unión a FKBP12-rapamicina (FRB); y un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido de caspasa quimérico, en donde el polipéptido de caspasa quimérico comprende (i) una región de multimerización de FKBP y (ii) un polipéptido de caspasa. En el presente documento también se describe una célula modificada, que comprende un primer polinucleótido que codifica un CAR, en donde el CAR comprende (i) una región transmembrana, (ii) un polipéptido MyD88 o un polipéptido MyD88 truncado que carece de un dominio TIR, (iii) un polipéptido citoplasmático de CD40 que carece de un dominio extracelular de CD40, (iv) una molécula de activación de linfocitos T, (v) un motivo de reconocimiento de antígeno y un dominio de unión a FKBP12-rapamicina (FRB); y un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido de caspasa quimérico, en donde el polipéptido de caspasa quimérico comprende (i) una región de multimerización de FKBP y (ii) un polipéptido de caspasa.

Los polinucleótidos que codifican los polipéptidos quiméricos pueden comprender codones optimizados. La célula puede ser una célula humana. La célula descrita en el presente documento puede ser cualquier tipo de célula eucariota, por ejemplo, una célula de mamífero, por ejemplo, una célula de caballo, perro, gato, vaca o ser humano. La célula puede ser una célula progenitora. La célula puede ser una célula progenitora hematopoyética. La célula puede seleccionarse entre el grupo que consiste en células estromales mesenquimales, células madre embrionarias y células madre pluripotentes inducibles. La célula puede ser un linfocito T. La célula puede obtenerse o prepararse a partir de médula ósea. La célula puede obtenerse o prepararse a partir de sangre de cordón umbilical. La célula puede obtenerse o prepararse a partir de sangre periférica. La célula puede obtenerse o prepararse a partir de células mononucleares de sangre periférica.

El polinucleótido que codifica el polipéptido quimérico o el polipéptido de Caspasa-9 modificado puede unirse operativamente a un promotor. El promotor puede estar regulado por el desarrollo y el polipéptido de Caspasa-9 se expresa en células diferenciadas por el desarrollo. El promotor puede ser específico de tejido y el polipéptido de Caspasa-9 puede expresarse en el tejido específico. El promotor puede activarse en linfocitos T activados. El promotor puede comprender una secuencia 5'LTR. La proteína quimérica puede comprender además un polipéptido marcador, por ejemplo, pero sin limitación, un polipéptido ΔCD19. El polipéptido de Caspasa-9 puede ser un polipéptido de Caspasa-9 truncado. El polipéptido de Caspasa-9 puede carecer del dominio de reclutamiento de caspasa.

En algunos aspectos de la presente solicitud, las células se transducen o transfectan con un vector vírico. El vector vírico puede ser, por ejemplo, pero sin limitación, un vector retrovírico, tal como, por ejemplo, pero sin limitación, un vector del virus de la leucemia murina; un vector SFG; un vector adenovírico o un vector lentivírico.

La célula puede estar aislada. La célula puede encontrarse en un sujeto humano. La célula puede trasplantarse a un sujeto humano.

Puede proporcionarse tratamiento personalizado en donde se determina el estadio o nivel de la enfermedad o afección antes de la administración del ligando multimérico, antes de la administración de una dosis adicional del ligando multimérico o en la determinación de un método y dosis implicados en la administración del ligando multimérico. Estos métodos pueden usarse en cualquiera de los métodos de cualquiera de las enfermedades o afecciones de la presente solicitud. En los casos donde estos métodos para evaluar al paciente antes de administrar el ligando se analizan en el contexto de la enfermedad de injerto contra hospedador, se entiende que estos métodos pueden aplicarse de manera similar al tratamiento de otras afecciones y enfermedades. Por lo tanto, por ejemplo, el método puede comprender administrar células terapéuticas a un paciente y puede comprender además identificar la presencia o ausencia de una afección en el paciente que requiere la eliminación de células terapéuticas transfectadas o transducidas del paciente; y administrar un ligando multimérico que se une a la región de multimerización, manteniendo una dosis posterior del ligando multimérico o ajustando una dosis posterior del ligando multimérico al paciente basándose en la presencia o ausencia de la afección identificada en el paciente. Asimismo, por ejemplo, el método puede comprender además determinar si administrar una dosis adicional o dosis adicionales del ligando multimérico al paciente basándose en la aparición de síntomas de la enfermedad de injerto contra hospedador en el paciente. El método puede comprender además identificar la presencia, ausencia o estadio de la enfermedad de injerto contra hospedador en el paciente y la administración de un ligando multimérico que se une a la región de multimerización, manteniendo una dosis posterior del ligando multimérico o ajustando una dosis posterior del ligando multimérico al paciente basándose en la presencia, ausencia o estadio de la enfermedad de injerto contra hospedador identificada en el paciente. El método puede comprender además identificar la presencia, ausencia o estadio de la enfermedad de injerto contra hospedador en el paciente y determinar si un ligando multimérico que se une a la región de multimerización debería administrarse al paciente o la dosis del ligando multimérico administrada posteriormente al paciente se ajusta basándose en la presencia, ausencia o estadio de la enfermedad de injerto contra hospedador identificada en el paciente. El método puede comprender además recibir información que comprende la presencia, la ausencia o el estadio de la enfermedad de injerto contra hospedador en el paciente; y administrar un ligando multimérico que se une a la región de multimerización, manteniendo una dosis posterior del ligando multimérico o ajustando una dosis posterior del ligando multimérico al paciente basándose en la presencia, ausencia o estadio de la enfermedad de injerto contra hospedador identificada en el paciente. El método puede comprender además identificar la presencia, ausencia o estadio de la enfermedad de injerto contra

hospedador en el paciente y transmitir la presencia, ausencia o estadio de la enfermedad de injerto contra hospedador a una persona que toma decisiones que administra un ligando multimérico que se une a la región de multimerización, mantiene una dosis posterior del ligando multimérico o ajusta una dosis posterior del ligando multimérico administrado al paciente basándose en la presencia, ausencia o estadio de la enfermedad de injerto contra hospedador identificada en el sujeto. El método puede comprender además identificar la presencia, ausencia o estadio de la enfermedad de injerto contra hospedador en el paciente y transmitir una indicación de administrar un ligando multimérico que se une a la región de unión multimérica, mantener una dosis posterior del ligando multimérico o ajustar una dosis posterior del ligando multimérico administrado al paciente basándose en la presencia, ausencia o estadio de la enfermedad de injerto contra hospedador identificada en el sujeto.

También se proporciona un método para administrar linfocitos T donantes a un paciente humano, que comprenden administrar un linfocito T transducido o transfectado de la presente solicitud a un paciente humano, en donde las células son linfocitos T humanos no aloempobrecidos.

Las células terapéuticas pueden administrarse a un sujeto que tiene un trastorno no maligno o donde se ha diagnosticado al sujeto un trastorno no maligno, tal como, por ejemplo, un trastorno de deficiencia inmunitaria primaria (por ejemplo, pero sin limitación, inmunodeficiencia combinada severa (SCID), inmunodeficiencia combinada (CID), deficiencia/defecto de linfocitos T congénito, inmunodeficiencia variable común (CVID), Enfermedad granulomatosa crónica, IPEX (inmunodeficiencia, poliendocrinopatía, enteropatía, ligada a X) o similar a IPEX, síndrome de Wiskott-Aldrich, deficiencia de ligando CD40, deficiencia de adhesión de leucocitos, deficiencia de DOCK 8, deficiencia de IL-10/deficiencia de receptor de IL-10, deficiencia de GATA 2, enfermedad linfoproliferativa ligada a X (XLP), hipoplasia de cartílago y cabello y similares), hematofagocitosis linfohistiocitosis (HLH) u otros trastornos hemofagocíticos, trastornos de insuficiencia de médula ósea hereditarios (tales como, por ejemplo, pero sin limitación, síndrome de Shwachman-Diamond, eritroblastopenia congénita de Blackfan-Diamond, disqueratosis congénita, anemia de Fanconi, neutropenia congénita y similares), hemoglobinopatías (tales como, por ejemplo, pero sin limitación, anemia de células falciformes, talasemia y similares), trastornos metabólicos (tales como, por ejemplo, pero sin limitación, mucopolisacaridosis, esfingolipidosis y similares) o un trastorno de osteoclastos (tal como, por ejemplo, pero sin limitación, osteopetrosis).

Las células terapéuticas pueden ser, por ejemplo, cualquier célula administrada a un paciente para un resultado terapéutico deseado. Las células pueden ser, por ejemplo, linfocitos T, linfocitos citolíticos naturales, linfocitos B, macrófagos, células de sangre periférica, células progenitoras hematopoyéticas, células de médula ósea o células tumorales. El polipéptido de Caspasa-9 modificado también puede usarse para eliminar células tumorales directamente. En una aplicación, pueden inyectarse vectores que comprenden polinucleótidos que codifican el polipéptido de Caspasa-9 modificado inducible en un tumor y después de 10-24 horas (para permitir la expresión de proteína), el ligando inductor, tal como, por ejemplo, AP1903, podría administrarse para desencadenar la apoptosis, provocando la liberación de antígenos tumorales al microambiente. Para mejorar adicionalmente el microambiente tumoral para que sea más inmunogénico, puede combinarse el tratamiento con uno o más adyuvantes (por ejemplo, IL-12, TLR, inhibidores de IDO, etc.). Las células pueden administrarse para tratar un tumor sólido, tal como, por ejemplo, administración de las células a un lecho tumoral. Puede administrarse un polinucleótido que codifica el polipéptido de Caspasa-9 quimérico como parte de una vacuna o mediante administración directa a un lecho tumoral, dando como resultado la expresión del polipéptido de Caspasa-9 quimérico en las células tumorales, seguido de la apoptosis de las células tumorales después de la administración del ligando inductor. Por lo tanto, en el presente documento también se describen vacunas de ácido nucleico, tales como vacunas de ADN, en donde la vacuna comprende un ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de Caspasa-9 inducible o modificado inducible de la presente solicitud. La vacuna puede administrarse a un sujeto, de este modo transformando o transduciendo las células diana *in vivo*. Después se administra el ligando inductor siguiendo los métodos de la presente solicitud.

El polipéptido de Caspasa-9 modificado puede ser un polipéptido de Caspasa-9 modificado truncado. El polipéptido de Caspasa-9 modificado puede carecer del dominio de reclutamiento de caspasa. El polipéptido de Caspasa-9 puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 o un fragmento de la misma o puede estar codificado por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 8 o un fragmento de la misma.

Los métodos pueden comprender además administrar un ligando multimérico que se une a la región de unión a ligando multimérico. La región de unión a ligando multimérico puede seleccionarse entre el grupo que consiste en FKBP, receptor de ciclofilina, receptor de esteroides, receptor de tetraciclina, subunidad de anticuerpo de cadena pesada, subunidad de anticuerpo de cadena ligera, anticuerpos monocatenarios formados por regiones variables de cadena pesada y ligera en tándem separadas por un dominio enlazador flexible y secuencias mutadas de los mismos. La región de unión a ligando multimérico puede ser una región FKBP12. El ligando multimérico puede ser un dímero de FK506 o un ligando análogo similar a FK506 dimérico. El ligando multimérico puede ser AP1903. Puede reducirse el número de células terapéuticas de aproximadamente un 60 % a un 99 %, de aproximadamente un 70 % a un 95 %, de un 80 % a un 90 % o aproximadamente un 90 % o más después de la administración del ligando multimérico. Después de la administración del ligando multimérico, pueden sobrevivir linfocitos T donantes en el paciente que son capaces de expandirse y de reactivarse frente a virus y hongos. Después de la administración del ligando multimérico, pueden sobrevivir linfocitos T donantes en el paciente que son capaces de

expandirse y de reactivarse frente a células tumorales en el paciente.

El gen de suicidio usado en el segundo nivel de control puede ser un polipéptido de caspasa, por ejemplo, Caspasa 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14. El polipéptido de caspasa puede ser un polipéptido de Caspasa-9. El polipéptido de Caspasa-9 puede comprender una secuencia de aminoácidos de un polipéptido variante de caspasa catalíticamente activo (no catalíticamente inactivo) proporcionado en la tabla 5 o 6 en el presente documento. El polipéptido de Caspasa-9 puede consistir en una secuencia de aminoácidos de un polipéptido variante de caspasa catalíticamente activo (no catalíticamente inactivo) proporcionado en la tabla 5 o 6 en el presente documento. Puede usarse un polipéptido de caspasa que tiene una baja actividad basal en ausencia del ligando inductor. Por ejemplo, cuando se incluye como parte de un polipéptido de caspasa inducible quimérico, ciertos polipéptidos de Caspasa-9 modificados pueden tener una menor actividad basal en comparación con Caspasa-9 de tipo silvestre en la construcción quimérica. Por ejemplo, el polipéptido de Caspasa-9 modificado puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia respecto de la SEQ ID NO: 9 y puede comprender al menos una sustitución de aminoácidos.

Breve descripción de los dibujos

Los dibujos ilustran la tecnología descrita en el presente documento y no son limitantes. Por claridad y facilidad de ilustración, los dibujos no se representan a escala y, en algunos casos, pueden mostrarse diversos aspectos exagerados o agrandados para facilitar la comprensión de aspectos particulares.

La Fig. 1A ilustra diversos vectores de expresión de iCasp9 como se analiza en el presente documento. La FIG. 1B ilustra un Western blot representativo de la proteína Caspasa-9 de longitud completa y truncada producida por los vectores de expresión mostrados en la FIG. 1A.

La Fig. 2 es un esquema de la interacción del producto de gen de suicidio y el CID para provocar apoptosis.

La Fig. 3 es un esquema que representa una regulación de la apoptosis en dos niveles. La sección izquierda representa el reclutamiento mediado por rapálogo de un polipéptido de caspasa inducible a CAR modificado por FRBI. La sección derecha representa un polipéptido de caspasa inducible mediado por rimiducid (AP1903).

La Fig. 4 es un mapa de plásmido de un vector que codifica FRB_L-modificado CD19-MC-CAR y Caspasa-9 inducible. pSFG-iCasp9-2A-CD19-Q-CD28stm-MCz-FRB_L2.

La Fig. 5 es un mapa de plásmido de un vector que codifica FRB_L-modificado Her2-MC-CAR y un polipéptido de Caspasa-9 inducible. pSFG-iCasp9-2A-aHer2-Q_CD28stm-mMCz-FRB_L2.

Las Fig. 6A y 6B proporcionan los resultados de un ensayo de activación de la apoptosis en dos etapas. La Fig. 6A muestra el reclutamiento de un polipéptido de Caspasa-9 inducible (iC9) con rapamicina, que da lugar a una titulación de la apoptosis más gradual. La Fig. 6B muestra la apoptosis completa usando rimiducid (AP1903).

La Fig. 7 es un mapa de plásmido del vector pBP0545, pBP0545.pSFG.iCasp9.2A.Her2scFv.Q.CD8stm.MC-zeta.

Las Fig. 8A-8C ilustran que los armazones basados en FRB o FKBP12 pueden multimerizar a los dominios de señalización. Fig. 8A. La homodimerización de un dominio de señalización (varilla roja), como Caspasa-9, puede lograrse mediante un heterodímero que se une al dominio de señalización fusionado a FRB en un lado y el dominio fusionado a FKBP12 en el otro. Fig. 8B. Dimerización o multimerización de un dominio de señalización mediante 2 (izquierda) o más (derecha) copias de FRB (cheurón). El armazón puede contener secuencias de direccionamiento subcelulares para localizar proteínas a la membrana plasmática (según se ilustra), el núcleo u orgánulos. Fig. 8C. Similar a la Fig. 8B, pero se invierte la polaridad del dominio.

Las Fig. 9A-9C proporcionan esquemas del armazón mediado por iMC de FRB_L2.Caspasa-9. Fig. 9A. En presencia de un fármaco heterodimérico, tal como rapamicina, la Caspasa-9 unida a FRB_L2 se une y agrupa con la molécula de señalización FKBP-modificado MyD88/CD40 (MC). Este efecto de agrupamiento da como resultado la dimerización de FRB_L2.Caspasa-9 y la posterior inducción de muerte celular por la vía apoptótica. Fig. 9B. Similar al panel 9A, aunque los dominios FKBP y FRB se han cambiado en relación con los dominios Caspasa-9 y MC asociados. El efecto de agrupamiento sigue produciéndose en presencia de fármaco heterodimérico. Fig. 9C. Similar al panel 9A; sin embargo, solo hay un dominio FKBP unido a MC. Por lo tanto, en presencia de heterodímero, la Caspasa-9 deja de ser capaz de agruparse y por lo tanto, no se induce apoptosis.

Las Fig. 10A-10E proporcionan esquemas de un CaspaCIDa basado en armazón de FRB inducido por rapálogo. Fig. 10A: Rimiducid homodimeriza Caspasa-9 ligada a FKBPv, dando como resultado la dimerización y activación de Caspasa-9 con la posterior inducción de muerte celular por la vía apoptótica. Fig. 10B: Los rapálogos heterodimerizan Caspasa-9 ligada a FKBPv con Caspasa-9 ligada a FRB, dando como resultado la dimerización de Caspasa-9 y la muerte celular. La Fig. 10C, la Fig. 10D, la Fig. 10E son esquemas que ilustran

que en presencia de un fármaco heterodimérico, tales como un rapálogo, 2 o más dominios FRB_L actúan como armazón para reclutar la unión de Caspasa-9 ligada a FKBPv, dando lugar a la dimerización u oligomerización de Caspasa-9 y la muerte celular.

La Fig. 11A es un esquema y la Figura 11B es un gráfico de líneas que representa la activación de la apoptosis mediante dimerización de un polipéptido quimérico de FRB-Caspasa-9 y un polipéptido quimérico de FKBP-Caspasa-9 (FRB_L-ΔCaspasa-9 y FKBPv-ΔCaspasa-9) con rapamicina. Fig. 11A. Representación esquemática de la dimerización de FRB y FKBP12 con rapamicina para fusionar los dominios de señalización de Caspasa-9 y la activación de la apoptosis. Fig. 11B. Se llevaron a cabo ensayos indicadores en células HEK-293T transfectadas con el indicador constitutivo SRα-SEAP (pBP046, 1 µg), una fusión de FRB_L (L2098) y ΔCaspasa-9 humana (pBP0463, 2 µg) y una fusión de FKBP12 con ΔCaspasa-9 (pBP0044, 2 µg).

La Fig. 12A es un esquema y las Fig. 12B y 12C son gráficos de líneas que representan el ensamblaje de FKBP-Caspasa-9 en un armazón basado en FRB. Fig. 12A: Esquema de dominios FRB iterados para proporcionar armazones para la multimerización mediada por rapamicina (o rapálogo) de una proteína de fusión FKBP12-Caspasa-9. Fig. 12B: Se transfectaron cultivos de células HEK-293 (mediante Genejuice, Novagen) con el plásmido indicador constitutivo SRα-SEAP (pBP0046, 1 µg), una fusión de FKBP12 humano con Caspasa-9 humana (pBP0044, 2 µg) y construcciones de expresión que codifican FRB, que contenían cuatro copias de FRB_L (pBP0725, 2 µg) o vectores de control que codificaban cero o una copia de FRB_L. 24 horas de la transfección, se distribuyeron las células en placas de 96 pocillos y se administró rapamicina o un rapálogo derivado, C7-isopropoxirapamicina, con especificidad para el FRB_L mutante (Liberles et al, 1997) en pocillos triplicados. Se determinó la actividad de SEAP placentario 24 horas después de la administración del fármaco. Fig. 12C: Se llevaron a cabo ensayos indicadores como en (B), pero los armazones de FRB se expresaron a partir de construcciones que codificaban dominios FRB_L iterados con una secuencia de direccionamiento-miristoilación amino-terminal y dos (pBP0465) o cuatro copias (pBP0721) del dominio FRB_L.

La Fig. 13A es un esquema y la Fig. 13B es un gráfico de líneas que representa el ensamblaje de FRB-ΔCaspasa-9 en un armazón de FKBP. Fig. 13A. Esquema de dominios FKBP12 iterados para producir armazones para el ensamblaje de la multimerización mediada por ensamblado rapamicina (o rapálogo) de la proteína de fusión FRB-ΔCaspasa-9, que da lugar a la apoptosis. Fig. 13B. Se llevaron a cabo ensayos indicadores como en las Fig. 12B y C con cultivos de células HEK-293T transfectadas con las construcciones de expresión de indicador de SRα-SEAP constitutivo (pBP046, 1 µg), una fusión de FRB_L (L2098) y ΔCaspasa-9 humana con el dominio CARD eliminado (pBP0463, 2 µg) y FKBP que contenían cuatro copias en tándem de FKBP12 (pBP722, 2 µg) o un vector de control con una copia de FKBP (pS-SF1E).

Las Fig. 14A-14B proporcionan gráficos de líneas que muestran que la heterodimerización del armazón de FRB_L con iCaspasa9 induce muerte celular. Se transdujeron linfocitos T primarios de tres donantes diferentes (307, 582, 584) con pBP0220-pSFG-iC9.T2A-ΔCD19, pBP0756-pSFG-iC9.T2A-ΔCD19.P2A-FRB_L, pBP0755-pSFG-iC9.T2A-ΔCD19.P2A-FRB_L2 o pBP0757-pSFG-iC9.T2A-ΔCD19.P2A-FRB_L3, que contenían CaspaCIDa, marcador de CD19 y 0-3 copias en tándem de FRB_L, respectivamente. Los linfocitos T se sembraron con diversas concentraciones de rapamicina y después de 24 y 48 horas se recogieron alícuotas de células, se tiñeron con anticuerpo APC-CD19 y se analizaron mediante citometría de flujo. Las células se clasificaron inicialmente como linfocitos vivos mediante FSC frente a SSC. Después, se representaron los linfocitos como un histograma de CD19 y se subclasificaron para alta, media y baja expresión en la clasificación de $CD19^+$. Los gráficos de líneas representan el porcentaje relativo de la población celular total que expresa altos niveles de CD19, normalizados al "0" de control sin fármaco. Todos los puntos de datos se realizaron en duplicados. Fig. 14A: donante 307, 24 h; Fig. 14B: donante 582, 24 h; Fig. 14C: donante 584, 24 h; Fig. 14D: donante 582, 48 h; Fig. 14E: donante 584, 48 h.

Las Fig. 15A-15C proporcionan gráficos de líneas y un esquema que muestran que la rapamicina induce eliminación CaspaCIDa en presencia de dominios FRB_L en tándem. Las células HEK-293 se transfectaron con 1 µg de plásmido indicador constitutivo SRα-SEAP junto con control negativo (Neg), eGFP (pBP0047), CaspaCIDa (iC9/pBP0044) solo o CaspaCIDa junto con iMC.FRB_L (pBP0655) + anti-HER2.CAR.Fpk2 (pBP0488) o iMC.FRB_L2 (pBP0498) + anti-HER2.CAR.Fpk2. Después, las células se sembraron en placas con diluciones semilogarítmicas de rimiducid o rapamicina y se ensayaron para SEAP como se había descrito previamente. La disminución de la actividad de SEAP se correlaciona con la eliminación celular. El esquema representa un posible complejo mediado por rapamicina de los dominios de señalización, que da lugar a la acumulación de Caspasa-9 y apoptosis. Fig. 15A: rimiducid; Fig. 15B: rapamicina; Fig. 15C: esquema.

Las Fig. 16A y 16B son gráficos de líneas que muestran que el armazón de FKBP en tándem media la activación de FRB_L2.Caspasa en presencia de rapálogos. Fig. 16A. Se transfectaron células HEK-293 con 1 µg de cada uno del plásmido indicador de SRα-SEAP, Δmyr.iMC.2A-anti-CD19.CAR.CD3ζ (pBP0608) y FRB_L2.Caspasa-9 (pBP0467). Tras 24 horas, las células transfectadas se recogieron y trataron con diversas concentraciones de rimiducid, rapamicina o rapálogo, C7-isopropoxi (IsoP)-rapamicina. Después de incubar durante una noche, se ensayaron los sobrenadantes celulares para la actividad de SEAP, como se ha descrito anteriormente. Fig. 16B. Similar al experimento descrito en la (Fig. 16A), excepto que las células se transfectaron con un iMC.2A-

CD19.CAR.CD3ζ (pBP0609) localizado en la membrana (miristoilado), en lugar de Δmyr.iMC.2A-CD19.CAR.CD3ζ (pBP0608) no miristoilado.

Las Fig. 17A-17E proporcionan gráficos de líneas y los resultados del análisis FACS muestran que el "interruptor" de iMC, FKBP2.MyD88.CD40, crea un armazón para FRB_L2.Caspasa9 en presencia de rapamicina, induciendo la muerte celular. Fig. 17A. Se transdujeron linfocitos T primarios (2 donantes) con γ-RV, SFG-ΔMyr.iMC.2A-CD19 (de pBP0606) y SFG-FRB_L2.Caspasa9.2A-Q.8stm.zeta (de pBP0668). Las células se emplacaron con diluciones de 5 veces de rapamicina. Tras 24 horas, se recogieron las células y se analizaron por citometría de flujo para la expresión de iMC (anti-CD19-APC), Caspasa-9 (anti-CD34-PE) y la identidad del linfocito T (anti-CD3-PerCPCy5.5). Las células se clasificaron inicialmente respecto la morfología de linfocitos mediante FSC frente a SSC, seguido de expresión de CD3 (-99 % de los linfocitos). Los linfocitos $CD3^+$ se representaron respecto de su expresión de CD19 (Δmyr.iMC.2A-CD19) frente a CD34 (FRB_L2.Caspasa9.2A-Q.8stm.zeta).
Para normalizar las poblaciones clasificadas, se dividieron los porcentajes de células $CD34^+CD19^+$ entre el porcentaje de células $CD19^+CD34^-$ en cada muestra como control interno. Después, se normalizaron estos valores a los pocillos libres de fármaco para transducción, que se ajustaron al 100 %. Se aplicó un análisis similar a las células con expresión alta, media y baja en la clasificación de $CD34^+CD19^+$. Fig. 17B. Ejemplo representativo de cómo se clasificaron las células para alta, media y baja expresión. Fig. 17C. Gráficas de dispersión representativas de las clasificaciones finales de CD34 frente a CD19. A medida que aumentó la rapamicina, se redujo el % de células $CD34^+CD19^+$, indicando la eliminación de células. Fig. 17D y Fig. 17E. Se transdujeron linfocitos T de un solo donante con ΔMyr.iMC.2A-CD19 (pBP0606) o FRB_L2.Caspasa9.2A-Q.8stm.zeta (pBP0668). Las células se sembraron en medio que contenía IL-2 junto con diversas concentraciones de rapamicina durante 24 o 48 h. Después, se recogieron y analizaron las células, como anteriormente.

Fig. 18 Mapa de plásmido de pBP0044: pSH1-iCaspasa9ts.

Fig. 19 Mapa de plásmido de pBP0463--pSH1-Fpk-Fpk'.LS.Fpk".Fpk"'.LS.HA.

Fig. 20 Mapa de plásmido de pBP0725--pSH1-FRBI.FRBI'.LS.FRBI".FRBI"."

Fig. 21 Mapa de plásmido de pBP0465--pSH1-M-FRBI.FRBI'.LS.HA.

Fig. 22 Mapa de plásmido de pBP0721--pSH1-M-FRBI.FRBI'.LS.FRBI".FRBI'"HA.

Fig. 23 Mapa de plásmido de pBP0722--pSH1-Fpk-Fpk'.LS.Fpk".Fpk"'.LS.HA.

Fig. 24 Mapa de plásmido de pBP0220--pSFG-iC9.T2A-ΔCD19.

Fig. 25 Mapa de plásmido de pBP0756--pSFG-iC9.T2A-dCD19.P2A-FRBI.

Fig. 26 Mapa de plásmido de pBP0755--pSFG-iC9.T2A-dCD19.P2A-FRBI2.

Fig. 27 Mapa de plásmido de pBP0757--pSFG-iC9.T2A-dCD19.P2A-FRBI3.

Fig. 28 Mapa de plásmido de pBP0655--pSFG-ΔMyr.FRBI.MC.2A-ΔCD19.

Fig. 29 Mapa de plásmido de pBP0498--pSFG-ΔMyr.iMC.FRBI2.P2A-ΔCD19.

Fig. 30 Mapa de plásmido de pBP0488--pSFG-aHER2.Q.8stm.CD3zeta.Fpk2.

Fig. 31 Mapa de plásmido de pBP0467--pSH1-FRBI'.FRBI.LS.ΔCaspasa9.

Fig. 32 Mapa de plásmido de pBP0606--pSFG-k-AMyr.iMC.2A-ΔCD19.

Fig. 33 Mapa de plásmido de pBP0607--pSFG-k-iMC.2A-ACD19.

Fig. 34 Mapa de plásmido de pBP0668--pSFG-FRBIx2.Caspasa9.2A-Q.8stm.CD3zeta.

Fig. 35 Mapa de plásmido de pBP0608--pSFG-AMyr.iMC.2A-ΔCD19.Q.8stm.CD3zeta.

Fig. 36 Mapa de plásmido de pBP0609: pSFG-iMC.2A-ΔCD19.Q.8stm.CD3zeta.

La Fig. 37A proporciona un esquema de la unión de rimiducid a dos copias de un polipéptido quimérico de Caspasa-9, teniendo cada uno una región de multimerización de FKBP12. La Fig. 37B proporciona un esquema de la unión de rapamicina a dos polipéptidos quiméricos de Caspasa-9, uno de los cuales tiene una región de multimerización de FKBP12 y el otro que tiene una región de multimerización de FRB. La Fig. 37C proporciona

una gráfica de los resultados de ensayo usando estos polipéptidos quiméricos.

La Fig. 38A proporciona un esquema de la unión de rapamicina o rapálogo a dos polipéptidos quiméricos de Caspasa-9, uno de los cuales tiene una región de multimerización de FKBP12v36 y el otro que tiene una región de multimerización de FRB variante (FRB_L). La Fig. 38B proporciona una gráfica de los resultados de ensayo usando este polipéptido quimérico.

La Fig. 39A proporciona un esquema de la unión de rimiducid a dos polipéptidos quiméricos de Caspasa-9, cada uno de los cuales tiene una región de multimerización de FKBP12v36 y la unión de rapamicina a solo un polipéptido quimérico de Caspasa-9 que tiene una región de multimerización de FKBP12v36. La Fig. 39B proporciona una gráfica de los resultados de ensayo que comparan los efectos de rimiducid y rapamicina.

La Fig. 40A proporciona un esquema de la unión de rimiducid a dos polipéptidos quiméricos de Caspasa-9, cada uno de los cuales tiene una región de multimerización de FKBP12v36 y la unión de rapamicina a solo un polipéptido quimérico de Caspasa-9 que tiene una región de multimerización de FKBP12v36 en presencia de un polipéptido de multimerización de FRB. La Fig. 40B proporciona una gráfica de los resultados de ensayo usando estos polipéptidos, que compara los efectos de rimiducid y rapamicina.

La Fig. 41 proporciona un mapa de plásmido de pBP0463.pFRBI.LS.dCasp9.T2A.

La Fig. 42 proporciona un mapa de plásmido de pBP044-pSH1.iCasp9WT.

Descripción detallada

Como mecanismo para traducir información del ambiente externo al interior de la célula, las interacciones reguladas de proteína-proteína evolucionaron para controlar la mayor parte de, si no todas, las vías de señalización. La transducción de señales está regida por procesos enzimáticos, tales como la fosforilación de cadenas laterales de aminoácidos, acetilación o escisión proteolítica que carecen de especificidad intrínseca. Además, muchas proteínas o factores están presentes a concentraciones celulares o en ubicaciones subcelulares que impiden la generación espontánea de una relación de sustrato/producto suficiente para activar o propagar la señalización. Un componente importante de la señalización activada es el reclutamiento de estos componentes a "nodos" de señalización o centros de señalización espacial que transmiten (o atenúan) eficazmente la vía a través de señales aguas arriba adecuadas.

Como herramienta para aislar artificialmente y manipular las interacciones proteína-proteína individuales y por lo tanto proteínas de señalización individuales, se desarrolló la tecnología de dimerización inducida químicamente (CID) para imponer interacciones homotípicas o heterotípicas en proteínas diana para reproducir la regulación biológica natural. En su forma más simple, podría modificarse una sola proteína para que contenga uno o más dominios de unión a ligando estructuralmente idénticos, que después podrían ser la base de la homodimerización u oligomerización, respectivamente, en presencia de un ligando homodimérico afín (Spencer DM et al (93) Science 262, 1019-24). Una versión ligeramente más complicada de este concepto podría implicar colocar uno o más dominios de unión a ligando distintos en dos proteínas diferentes para permitir la heterodimerización de estas moléculas de señalización usando ligandos heterodiméricos de molécula pequeña que se unen a ambos dominios distintos simultáneamente (Ho SN et al (96) Nature 382, 822-6). Esta dimerización mediada por fármaco crea una concentración local muy elevada de componentes marcados con dominio de unión a ligando suficientes para permitir su ensamblaje y regulación inducidos o espontáneos.

En el presente documento también se describen métodos para inducir la multimerización de proteínas. En este caso, se usan dos o más regiones de unión a ligando heterodimérico (o "dominios") en tándem como "armazón molecular" para dimerizar u oligomerizar una segunda proteína que contiene dominio de dimerización que está fusionada a una o más copias del segundo sitio de unión para el ligando heterodimérico. El armazón molecular puede expresarse como un multímero aislado de dominios de unión a ligando (Fig. 8), ya estén localizados en la célula o no localizados (Fig. 8B, 8C) o puede unirse a otra proteína que proporciona una función combinatoria estructural, de señalización, de marcación celular o más compleja (Fig. 9). Por "armazón" se entiende un polipéptido que comprende al menos dos, por ejemplo, dos o más, regiones de unión a ligando heterodimérico; en ciertos ejemplos, las regiones de unión a ligando se encuentran en tándem, es decir, cada región de unión a ligando está localizada directamente proximal a la siguiente región de unión a ligando. En otros ejemplos, cada región de unión a ligando puede estar ubicada próxima a la siguiente región de unión a ligando, por ejemplo, separada por aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16,17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 o más aminoácidos, pero conserva la función de dimerización del armazón de una molécula de caspasa activada en presencia de un dimerizador. Un armazón puede comprender, por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12,13, 14,15, 16, 17, 18, 19, 20 o más regiones de unión a ligando y también puede ligarse a otro polipéptido, tal como, por ejemplo, un polipéptido marcador, una molécula coestimulante, un receptor de antígeno quimérico, un receptor de linfocitos T o similares.

El primer polipéptido puede consistir esencialmente en al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 unidades de la primera región de multimerización. El primer polipéptido

puede consistir esencialmente en la región de armazón. El primer polipéptido puede consistir esencialmente en una región de asociación a membrana o una región de direccionamiento a membrana. Por "consiste esencialmente en" se entiende que las unidades de armazón o el armazón puede encontrarse solo, puede incluir opcionalmente polipéptidos enlazadores en uno de los dos extremos del marcador o entre las unidades y puede incluir opcionalmente polipéptidos pequeños, tales como, por ejemplo, polipéptidos de tallo, como se muestra en las Fig. 10B, 10C, 10D y 10E.

En un ejemplo, también se usa un multímero en tándem del dominio de unión a FK506-rapamicina (FRB) de ~ 89 aa de la proteína quinasa mTOR (Chen J et al (95) PNAS, 92, 4947-51) para reclutar múltiples Caspasa-9 fusionadas a FKBPv36 (CaspaCIDa/iCaspasa-9) en presencia de rapamicina o un análogo a base de rapamicina ("rapálogo") (Liberles SD (97) PNAS 94, 7825-30; Rivera VM (96) Nat Med 2, 1028-1032, Stankunas K (03) Mol Cell 12, 1615-24; Bayle JH (06) Chem & Biol, 13, 99-107) (Fig. 1-3). Este reclutamiento da lugar a la dimerización y activación espontánea de la caspasa.

En un segundo ejemplo, los dominios FRB en tándem se fusionan a un receptor de antígeno quimérico (CAR) y esto proporciona la activación de CaspaCIDa impulsada por rapálogo a células que expresan ambas proteínas de fusión (Fig. 15, recuadro).

En un tercer ejemplo, la polaridad de las dos proteínas se invierte, de tal forma que se usan dos o más copias de FKBP12 para reclutar y multimerizar moléculas de señalización modificadas con FRB en presencia de rapamicina (Fig. 8C, 9A).

En algunos ejemplos, un polipéptido quimérico puede comprender una sola región de unión a ligando o un armazón que comprende más de una región a ligando, donde el polipéptido quimérico comprende un polipéptido, tal como, por ejemplo, un polipéptido MyD88, un polipéptido MyD88 truncado, un polipéptido CD40 citoplasmático, un polipéptido quimérico MyD88/CD40 citoplasmático o un polipéptido quimérico MyD88 truncado/CD40 citoplasmático:
En un cuarto ejemplo, se usan variantes de FRB inestables (por ejemplo, FRBL2098) para desestabilizar la molécula de señalización antes de la administración del rapálogo (Stankunas K (03) Mol Cell 12, 1615-24; Stankunas K (07) ChemBioChem 8, 1162-69) (Fig. 9, 10). Después de la exposición al rapálogo, se estabiliza la molécula de fusión inestable, lo que da lugar a agregación, como en el caso anterior, pero con una menor señalización de fondo.

El uso de ligandos para dirigir a las proteínas de señalización puede aplicarse generalmente para activar o atenuar muchas vías de señalización. En el presente documento se proporcionan ejemplos que demuestran la utilidad de la estrategia mediante el control de la apoptosis o de la muerte celular programada con la "caspasa iniciadora", Caspasa-9 como la diana primaria. El control de la apoptosis mediante dimerización de proteínas proapoptóticas con la ampliamente disponible rapamicina o más rapálogos patentados, debería permitir a un experimentalista o profesional clínico controlar estrecha y rápidamente la viabilidad de un implante a base de células que presenta efectos no deseados. Los ejemplos de estos efectos incluyen, pero sin limitación, respuesta inmunitaria de injerto contra hospedador (GvH) contra tejido fuera de la diana o un crecimiento excesivo e incontrolado o metástasis de un implante. La rápida inducción de la apoptosis atenuará gravemente la función celular no deseada y permitirá la eliminación natural de las células muertas por células fagocíticas, tales como macrófagos, sin inflamación indebida.
La apoptosis está estrechamente regulada y de manera natural usa armazones, tales como Apaf-1, CRADD/RAIDD o FADD/Mort1, para oligomerizar y activar las caspasas, que en última instancia pueden eliminar a la célula. Apaf-1 puede ensamblar la proteasa apoptótica Caspasa-9 en un complejo latente que posteriormente forma un apoptosoma oligomérico activo tras el reclutamiento del citocromo C al armazón. El evento clave es la oligomerización de las unidades de armazón, provocando la dimerización y activación de la caspasa. Los adaptadores similares, tales como CRADD, pueden oligomerizar a Caspasa-2, que da lugar a la apoptosis. Las composiciones y los métodos proporcionados en el presente documento emplean, por ejemplo, versiones multiméricas de los dominios de unión a ligando FRB o FKBP para servir como armazones que permiten la dimerización y activación espontánea de las unidades de caspasa presentes como fusiones de FRB o FKBP tras el reclutamiento con rapamicina.

Usando algunos de los métodos proporcionados en los ejemplos en el presente documento, se produce la activación de caspasa solo cuando están presentes rapamicina o rapálogos para reclutar la caspasa fusionada a FRB o FKBP al armazón. En estos métodos, los polipéptidos de FRB o FKBP han de estar presentes como una unidad multimérica y no como monómeros para impulsar la dimerización de FKBP o FRB-caspasa (excepto cuando se dimeriza FRB-Caspasa-9 con FKBP-Caspasa-9). El armazón basado en FRB o FKBP puede expresarse en una célula diana como una fusión con otras proteínas y conserva su capacidad para servir como armazón para ensamblar y activar moléculas proapoptóticas. El armazón de FRB o FKBP puede localizarse en el citosol en forma de una entidad soluble o presente en localizaciones subcelulares específicas, tales como la membrana plasmática a través de señales de direccionamiento. Los compartimentos usados para activar la apoptosis y los componentes aguas abajo que degradan la célula son compartidos por todas las células y entre las distintas especies. Con respecto a la activación de Caspasa-9, estos métodos pueden utilizarse ampliamente en líneas celulares, en células primarias normales, tales como, por ejemplo, pero sin limitación, linfocitos T o en implantes de células.

En ciertos ejemplos de la dimerización directa de FRB-Caspasa con FKBP-Caspasa con rapamicina para dirigir la

apoptosis, se ha demostrado que las caspasas fusionadas a FKBP pueden dimerizarse mediante moléculas de homodimerizador, tales como AP1510, AP20187 o AP1903 (Fig. 6 (panel derecho), 10A (esquema) (Puede dirigirse un interruptor proapoptótico similar mediante la heterodimerización de un interruptor binario usando rapamicina o rapálogos mediante la coexpresión de una proteína de fusión de FRB-Caspasa-9 junto con FKBP-Caspasa-9, lo que da lugar a la homodimerización de los dominios de caspasa con las proteínas quiméricas (Fig. 8A (esquema), 10B (esquema), 11).

Como se usa en el presente documento, el uso del término "un" o "una", cuando se usa junto con el término "que comprende" en las reivindicaciones y/o en la memoria descriptiva puede significar "uno", pero también es consistente con el significado de "uno o más", "al menos uno", y "uno o más de uno". Aún más, las expresiones "que tiene", "que incluye", "que contiene" y "que comprende" son intercambiables y un experto en la materia será consciente de que estos términos son términos abiertos.

El término "alogénico", como se usa en el presente documento, se refiere a locus de HLA o MHC que son antigénicamente distintos.

Por lo tanto, las células o tejidos transferidos de la misma especie pueden ser antigénicamente distintos. Los ratones singénicos pueden diferir en uno o más locus (congénicos) y los ratones alogénicos pueden tener el mismo acervo genético.

El término "antígeno", como se usa en el presente documento, se define como una molécula que provoca una respuesta inmunitaria. Esta respuesta inmunitaria puede implicar o bien la producción de anticuerpos o la activación de células inmunocompetentes específicas o ambos.

Un "motivo de reconocimiento de antígeno" puede ser cualquier polipéptido o fragmento del mismo, tal como, por ejemplo, un dominio variable de un fragmento de anticuerpo, ya sea de origen natural o sintético, que se une a un antígeno. Los ejemplos de motivos de reconocimiento de antígeno incluyen, pero sin limitación, polipéptidos procedentes de anticuerpos, tales como, por ejemplo, fragmentos variables monocatenarios (scFv), fragmentos Fab, Fab', F(ab')2 y Fv; polipéptidos procedentes de receptores de linfocitos T, tales como, por ejemplo, dominios variables de TCR; y cualquier fragmento de ligando o receptor que se una a la proteína extracelular afín.

El término "cáncer", como se usa en el presente documento, se define como una hiperproliferación de células cuyos rasgos únicos - pérdida de controles normales - da como resultado un crecimiento no regulado, pérdida de diferenciación, invasión de tejidos locales y metástasis. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, melanoma, no microcítico de pulmón, microcítico de pulmón, pulmón, hepatocarcinoma, leucemia, retinoblastoma, astrocitoma, glioblastoma, goma, lengua, neuroblastoma, cabeza, cuello, mama, pancreáticos, próstata, renales, hueso, testicular, ovárico, mesotelioma, cervical, gastrointestinal, linfoma, cerebro, colon, sarcoma o vejiga.

Donante: El término "donante" se refiere a un mamífero, por ejemplo, un ser humano, que no es paciente receptor. El donante puede, por ejemplo, tener identidad de HLA con el receptor o puede tener una disparidad de HLA parcial o mayor con el receptor.

Haploidéntico: El término "haploidéntico", como se usa con referencia a células, tipos de células y/o linajes celulares, se refiere en el presente documento a células que comparten un haplotipo o a células que tienen sustancialmente los mismos alelos en un conjunto de genes estrechamente ligado en un cromosoma. Un donante haploidéntico no tiene una identidad de HLA completa con el receptor, hay una disparidad parcial de HLA.

Enfermedad sanguínea: Las expresiones "enfermedad sanguínea", y/o "enfermedad de la sangre", como se usan en el presente documento, se refieren a afecciones que afectan a la producción de la sangre y sus componentes, incluyendo, pero sin limitación, células sanguíneas, hemoglobina, proteínas sanguíneas, el mecanismo de coagulación, la producción de sangre, la producción de proteínas sanguíneas, similares y combinaciones de los mismos. Los ejemplos no limitantes de enfermedades sanguíneas incluyen anemias, leucemias, linfomas, neoplasias hematológicas, albuminemias, hemofilias y similares.

Enfermedad de médula ósea: La expresión "enfermedad de médula ósea", como se usa en el presente documento, se refiere a condiciones que dan lugar a una reducción en la producción de células sanguíneas y plaquetas sanguíneas. En algunas enfermedades de la médula ósea, la arquitectura normal de la médula ósea puede afectarse por infecciones (por ejemplo, tuberculosis) o neoplasias malignas, que a su vez pueden dar lugar a la reducción en la producción de células sanguíneas y plaquetas sanguíneas. Los ejemplos no limitantes de enfermedades de la médula ósea incluyen leucemias, infecciones bacterianas (por ejemplo, tuberculosis), enfermedad o envenenamiento por radiación, apnocitopenia, anemia, mieloma múltiple y similares.

Linfocitos T y linfocitos T activados (se incluye que esto significa células $CD3^+$): Las células T (también citadas como linfocitos T) pertenecen a un grupo de glóbulos blancos denominados linfocitos. Los linfocitos normalmente están implicados en la inmunidad mediada por células. La "T" en "linfocitos T" se refiere a células derivadas o cuya maduración está influenciada por el timo. Los linfocitos T pueden distinguirse de otros tipos de linfocitos, tales como

los linfocitos B o los linfocitos citolíticos naturales (NK) por la presencia de proteínas de superficie conocidas como receptores de linfocitos T. La expresión "linfocitos T activados", como se usa en el presente documento, se refiere a linfocitos T que se han estimulado para producir una respuesta inmunitaria (por ejemplo, expansión clonal de linfocitos T activados) mediante el reconocimiento de un determinante antigénico presentado en el contexto de un marcador del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II. Los linfocitos T se activan por la presencia de un determinante antigénico, citoquinas y/o linfoquinas y de proteínas de superficie del cúmulo de diferenciación celular (por ejemplo, CD3, CD4, CD8, similares y combinaciones de los mismos). Se dice que las células que expresan una proteína de cúmulo de diferenciación son "positivas" para la expresión de esa proteína en la superficie de los linfocitos T (por ejemplo, células positivas para la expresión de CD3 o CD 4 se citan como $CD3^+$ o $CD4^+$). Las proteínas CD3 o CD4 son receptores o correceptores de la superficie celular que pueden estar implicados directa y/o indirectamente en la transducción de señales en los linfocitos T.

Sangre periférica: La expresión "sangre periférica", como se usa en el presente documento, se refiere a componentes celulares de la sangre (por ejemplo, glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas), que se obtienen o preparan a partir del grupo circulante de la sangre y no están secuestrados en el sistema linfático, el bazo, el hígado o la médula ósea.

Sangre de cordón umbilical: La sangre del cordón umbilical es distinta de la sangre periférica y la sangre secuestrada en el sistema linfático, el bazo, el hígado o la médula ósea. Las expresiones "sangre de cordón umbilical", "sangre umbilical" o "sangre del cordón", que pueden usarse indistintamente, se refieren a sangre que permanece en la placenta y el cordón umbilical unido después del parto. La sangre del cordón normalmente contiene células madre que incluyen células hematopoyéticas.

Por "CD40 citoplasmático" o "CD40 que carece del dominio extracelular de CD40" se entiende un polipéptido de CD40 que carece del dominio extracelular de CD40. En algunos ejemplos, el término también se refiere a un polipéptido de CD40 que carece tanto del dominio extracelular de CD40 como de una porción o la totalidad, del dominio transmembrana de CD40.
Por "obtenido o preparado" como, por ejemplo, en el caso de células, se entiende que las células o el cultivo celular se aíslan, purifican o purifican parcialmente a partir de la fuente, donde la fuente puede ser, por ejemplo, sangre de cordón umbilical, médula ósea o sangre periférica. Los términos también pueden aplicarse al caso donde la fuente original o un cultivo celular, se ha cultivado y las células se han replicado y donde las células descendientes proceden de la fuente original.

Por "eliminar" o "eliminación", como en un porcentaje de células eliminadas, se entiende la muerte de una célula mediante apoptosis, medida usando cualquier método para medir la apoptosis y, por ejemplo, usando los ensayos analizados en el presente documento, tales como, por ejemplo, los ensayos de SEAP o ensayos de linfocitos T analizados en el presente documento. El término también puede referirse a la ablación de células.

Aloempobrecimiento: El término "aloempobrecimiento", como se usa en el presente documento, se refiere al empobrecimiento selectivo de linfocitos T alorreactivos. La expresión "linfocitos T alorreactivos", como se usa en el presente documento, se refiere a linfocitos T activados para producir una respuesta inmunitaria en respuesta a la exposición a células extrañas, tal como, por ejemplo, en un aloinjerto trasplantado. El empobrecimiento selectivo implica generalmente usar como diana diversos marcadores o proteínas expresados en la superficie celular, (por ejemplo, en ocasiones proteínas del cúmulo de diferenciación (proteínas CD), CD19 o similares), para su eliminación usando inmunoimanes, inmunotoxinas, clasificación de flujo, inducción de la apoptosis, técnicas de fotoempobrecimiento, similares o combinaciones de los mismos. En los métodos actuales, las células pueden transducirse o transfectarse con el vector que codifica la proteína quimérica antes o después del aloempobrecimiento. Asimismo, pueden transducirse o transfectarse las células con el vector que codifica la proteína quimérica sin una etapa de aloempobrecimiento y las células no aloempobrecidas pueden administrarse al paciente. Debido a la adición del "interruptor de seguridad" es, por ejemplo, posible administrar los linfocitos T no aloempobrecidos (o solo parcialmente aloempobrecidos) debido a que un acontecimiento adverso, tal como, por ejemplo, enfermedad de injerto contra huésped, puede aliviarse tras la administración del ligando multimérico.

Enfermedad de injerto contra hospedador: Las expresiones "enfermedad de injerto contra hospedador" o "GvHD", se refieren a una complicación frecuentemente asociada con el trasplante alogénico de médula ósea y en ocasiones se asocia con transfusiones de sangre no irradiada a pacientes inmunocomprometidos. La enfermedad de injerto contra hospedador puede producirse cuando las células inmunitarias funcionalizadas en la médula trasplantada reconocen al receptor como "extraño" y arma una respuesta inmunológica. La GvHD puede dividirse en una forma aguda y una forma crónica. La GVHD aguda (aGVHD) se observa normalmente en los primeros 100 días después del trasplante o la transfusión y puede afectar al hígado, piel, mucosa, sistema inmunitario (por ejemplo, el sistema hematopoyético, médula ósea, timo y similares), pulmones y tracto gastrointestinal. La GVHD crónica (cGHVD) comienza normalmente 100 días o más tarde después del trasplante o la transfusión y puede atacar a los mismos órganos que la GvHD aguda, pero también puede afectar al tejido conectivo y a las glándulas exocrinas. La GvHD aguda de la piel puede dar como resultado una erupción macropapular difusa, en ocasiones en un patrón intricado.

Linfocito T donante: La expresión "linfocito T donante", como se usa en el presente documento, se refiere a linfocitos

T que normalmente se administran a un receptor para conferir inmunidad antivírica y/o antitumoral después del trasplante de células madre alogénicas. Los linfocitos T donantes normalmente se utilizan para inhibir el rechazo de médula ósea y aumentar el éxito del aloinjerto, aunque los mismos linfocitos T donantes pueden provocar una respuesta aloagresiva contra antígenos del hospedador, lo que a su vez puede dar como resultado enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD). Ciertos linfocitos T donantes activados pueden provocar una mayor o menor respuesta de GvHD que otros linfocitos T activados. Los linfocitos T donantes también pueden ser reactivos contra células tumorales del receptor, provocando un efecto de injerto contra tumor beneficioso.

Célula estromal mesenquimal: Las expresiones "célula estromal mesenquimal" o "célula estromal mesenquimal procedente de médula ósea", como se usan en el presente documento, se refieren a células madre multipotentes que pueden diferenciarse *ex vivo*, *in vitro* e *in vivo* en adipocitos, osteoblastos y condroblastos y pueden definirse adicionalmente como una fracción de células madre mononucleares de médula ósea que se adhieren a placas de cultivo de plástico en condiciones de cultivo convencionales, son negativas para marcadores de linaje hematopoyético y son positivas para CD73, CD90 y CD105.

Célula madre embrionaria: La expresión "célula madre embrionaria", como se usa en el presente documento, se refiere a células madre pluripotentes procedentes de la masa celular interna del blastocisto, un embrión en estadio temprano de entre 50 a 150 células. Las células madre embrionarias se caracterizan por su capacidad para renovarse solas de manera indefinida y por su capacidad para diferenciarse en derivados de las tres capas germinales primarias, ectodérmicas, endodermo y mesodermo. Pluripotente se diferencia de multipotente en que las células pluripotentes pueden generar todos los tipos de células, mientras que las células multipotentes (por ejemplo, células madre adultas) pueden producir únicamente un número limitado de tipos celulares.

Célula madre pluripotente inducible: Las expresiones "célula madre pluripotente inducible" o "célula madre pluripotente inducida", como se usa en el presente documento, se refiere a células adultas o diferenciadas, que se "reprograman" o inducen mediante manipulación genética (por ejemplo, expresión de genes que a su vez activan la pluripotencia), biológica (por ejemplo, tratamiento con virus o retrovirus) y/o química (por ejemplo, moléculas pequeñas, péptidos y similares) para generar células que son capaces de diferenciarse en muchos si no todos los tipos celulares, como las células madre embrionarias. Las células madre pluripotentes inducibles se distinguen de las células madre embrionarias en que logran un estado intermedio o terminalmente diferenciado (por ejemplo, células de la piel, células óseas, fibroblastos y similares) y después se las induce para que se desdiferencien, recuperando de este modo la totalidad o parte de la capacidad para generar células multipotentes o pluripotentes.
Célula $CD34^+$: La expresión "célula $CD34^+$", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula que expresa la proteína CD34 en su superficie celular. "CD34", como se usa en el presente documento, se refiere a una glucoproteína de la superficie celular (por ejemplo, proteína de sialomucina) que normalmente actúa como un factor de adhesión de célula-célula y está implicado en la entrada del linfocito T en los ganglios linfáticos y es un miembro de la familia génica del "cúmulo de diferenciación". CD34 también puede mediar la unión de células madre a la médula ósea, la matriz extracelular o directamente a células estromales. Las células $CD34^+$ se encuentran normalmente en el cordón umbilical y la médula ósea como células hematopoyéticas, un subconjunto de células madre mesenquimales, células progenitoras endoteliales, células endoteliales de los vasos sanguíneos pero no linfáticos (excepto linfáticos pleurales), mastocitos, una subpoblación de células dendríticas (que son negativas para factor XIIIa) en el intersticio y alrededor de la anexa de la dermis de la piel, así como células en ciertos tumores de tejidos blandos (por ejemplo, sarcoma de partes blandas alveolares, leucemia linfoblástica aguda pre-B (Pre-B-ALL), leucemia mielógena aguda (LMA), AML-M7, dermatofibrosarcoma protuberante, tumores estromales gastrointestinales, fibrosarcoma de células gigantes, sarcoma granulocítico, sarcoma de Kaposi, liposarcoma, histiocitoma fibroso maligno, tumores malignos de la vaina de nervios periféricos, hemangiopericitomas meníngeos, meningiomas, neurofibromas, schwannomas y carcinoma papilar de tiroides).

Vector de expresión génica: Las expresiones "vector de expresión génica", "vector de expresión de ácido nucleico" o "vector de expresión", como se usan en el presente documento, que pueden usarse indistintamente a lo largo del documento, se refieren generalmente a una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un plásmido, fago, secuencia de replicación autónoma (ARS), cromosoma artificial, cromosoma artificial de levadura (por ejemplo, YAC)) que puede replicarse en una célula hospedadora y utilizarse para introducir un gen o genes en una célula hospedadora. Los genes introducidos en el vector de expresión pueden ser genes endógenos (por ejemplo, un gen normalmente encontrado en la célula u organismo hospedador) o genes heterólogos (por ejemplo, genes no encontrados normalmente en el genoma o en ácidos nucleicos extracromosómicos de la célula u organismo hospedador). Los genes introducidos en una célula por un vector de expresión pueden ser genes nativos o genes que se han modificado o diseñado por ingeniería genética. El vector de expresión génica también puede modificarse para que contenga secuencias reguladoras 5' y 3' no traducidas que en ocasiones pueden funcionar como secuencias potenciadoras, regiones promotoras y/o secuencias terminadoras que pueden facilitar o potenciar la transcripción eficaz del gen o genes portados en el vector de expresión. Un vector de expresión génica se modifica en ocasiones para su funcionalidad de replicación y/o expresión (por ejemplo, transcripción y traducción) en un tipo celular, una ubicación celular o un tipo celular particular. En ocasiones, los vectores de expresión incluyen un marcador de selección para el mantenimiento del vector en la célula hospedadora o receptora.

Promotor regulado en el desarrollo: La expresión "promotor regulado en el desarrollo", como se usa en el presente

documento, se refiere a un promotor que actúa como el sitio de unión inicial para la ARN polimerasa para transcribir un gen que se expresa en ciertas condiciones que se controlan, inician o influencian por un programa o vía del desarrollo. Normalmente, los promotores regulados en el desarrollo tienen regiones de control adicionales en o próximas a la región promotora para la unión de activadores o represores de la transcripción que pueden influenciar la transcripción de un gen que forma parte de un programa o vía del desarrollo. En ocasiones, los promotores regulados en el desarrollo están implicados en la transcripción de genes cuyos productos génicos influencian la diferenciación en el desarrollo de células.

Células diferenciadas en el desarrollo: La expresión "células diferenciadas en el desarrollo", como se usa en el presente documento, se refiere a células que han sufrido un proceso, que normalmente implica la expresión de genes específicos regulados en el desarrollo, mediante los cuales la célula evoluciona de una forma menos especializada en una forma más especializada para llevar a cabo una función específica. Los ejemplos no limitantes de células diferenciadas en el desarrollo son las células hepáticas, células de pulmón, células de la piel, células nerviosas, células sanguíneas y similares. Los cambios en la diferenciación en el desarrollo implican generalmente cambios en la expresión génica (por ejemplo, cambios en los patrones de expresión génica), reorganización genética (por ejemplo, remodelado de la cromatina para esconder o exponer genes que se silenciarán o expresarán, respectivamente) y en ocasiones implica cambios en secuencias de ADN (por ejemplo, diferenciación de la diversidad inmunitaria). La diferenciación celular durante el desarrollo puede entenderse como el resultado de una red reguladora génica. Un gen regulador y sus módulos reguladores en cis son nódulos en una red reguladora génica que recibe una entrada (por ejemplo, proteína expresada aguas arriba en una vía o programa de desarrollo) y crea una salida en otra parte en la red (por ejemplo, el producto génico expresado actúa en otros genes aguas abajo en la vía o programa de desarrollo).

Los términos "célula", "línea celular," y "cultivo celular", como se usan en el presente documento, pueden usarse indistintamente. Todos estos términos también incluyen su descendencia, que es cualquiera de y todas las generaciones posteriores. Se entiende que toda la descendencia puede no ser idéntica debido a mutaciones deliberadas o accidentales.

Como se usa aquí, el término "rapálogo" se entiende como un análogo del antibiótico natural rapamicina. Ciertos rapálogos, como se describen en el presente documento, tienen propiedades tales como estabilidad en suero, baja afinidad por FRB de tipo silvestre (y por tanto la proteína precursora, mTOR, que da lugar a la reducción o eliminación de propiedades inmunosupresoras) y una afinidad relativamente elevada por un dominio FRB mutante. Para fines comerciales, los rapálogos pueden tener propiedades de escalado y producción útiles. Los ejemplos de rapálogos incluyen, pero sin limitación, S-o,p-dimetoxifenil(DMOP)-rapamicina: CE_{50} (ts FRB (K2095 T2098 W2101) ~ 1000 nM), EC_{50} (FRB-KLW ~ 5 nM) Luengo JI (95) Chem & Biol 2:471-81; Luengo JI (94) J. Org Chem 59:6512-6513; Patente de los Estados Unidos 6187757; R-isopropoxirrapamicina: CE_{50} (ts FRB (K2095 T2098 W2101) ~ 300 nM), CE50 (FRB-PLF ~ 8,5 nM); Liberles S (97) PNAS 94: 7825-30; y S-butanosulfonamidorap (AP23050): CE_{50} (ts FRB (K2095 T2098 W2101) ~ 2,7 nM), CE_{50} (FRB-KTF ~ >200 nM) Bayle (06) Chem & Bio. 13: 99-107.

La expresión "FRB" se refiere al dominio de unión de FKBP12-Rapamicina (FRB) (residuos 2015-2114 codificados en mTOR) y análogos del mismo. Asimismo, se proporcionan variantes de FRB. Las propiedades de una variante de FRB son estabilidad (algunas variantes son más lábiles que otras) y capacidad para unirse a diversos rapálogos. Basándose en la estructura cristalina conjugada con rapamicina, hay 3 residuos de interacción con rapamicina que se han analizado en más detalle, K2095, T2098 y W2101. La mutación de los tres da lugar a una proteína inestable que puede estabilizarse en presencia de rapamicina o algunos rapálogos. Puede usarse esta característica para aumentar adicionalmente la relación de señal:ruido en algunas aplicaciones. Se analizan ejemplos de mutantes en Bayle et al (06) Chem & Bio 13: 99-107; Stankunas et al (07) Chembiochem 8:1162-1169; y Liberies S (97) PNAS 94:7825-30). Los ejemplos de regiones FRB como se describen en el presente documento incluyen, pero sin limitación, KLW (con L2098); KTF (con F2101); y KLF (L2098, F2101).

Cada ligando puede incluir dos o más porciones (por ejemplo, porciones definidas, porciones distintas) y en ocasiones incluye dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más porciones. Cada uno del primer ligando y el segundo ligando pueden consistir, independientemente, en dos porciones (es decir, dímero, consistir en tres porciones (es decir, trímero) o consistir en cuatro porciones (es decir, tetrámero). En ocasiones, el primer ligando incluye una primera porción y una segunda porción y el segundo ligando en ocasiones incluye una tercera porción y una cuarta porción. En ocasiones, la primera porción y la segunda porción son diferentes (es decir, heterogéneas (por ejemplo, heterodímero)), en ocasiones, la primera porción y la tercera porción son diferentes y en ocasiones son iguales y normalmente la tercera porción y la cuarta porción son iguales (es decir, homogéneas (por ejemplo, homodímero)). Las porciones que son diferentes en ocasiones tienen una función diferente (por ejemplo, unión a la primera región de multimerización, unión a la segunda región de multimerización, no se unen significativamente a la primera región de multimerización, no se une significativamente a la segunda región de multimerización (por ejemplo, la primera porción se une a la primera región de multimerización pero no se une significativamente a la segunda región de multimerización) y en ocasiones tiene una estructura química diferente. Las porciones que son diferentes en ocasiones tienen una estructura química diferente pero pueden unirse a la misma región de multimerización (por ejemplo, la segunda porción y la tercera porción pueden unirse a la segunda región de multimerización pero pueden tener diferentes estructuras). La primera porción en ocasiones se une a la

primera región de multimerización y en ocasiones no se une significativamente a la segunda región de multimerización. En ocasiones, cada porción se cita como un "monómero" (por ejemplo, primer monómero, segundo monómero, tercer monómero y cuarto monómero que rastrea a la primera porción, la segunda porción, la tercera porción y la cuarta porción, respectivamente). En ocasiones, cada porción se cita como un "lado". Los lados de un ligando pueden en ocasiones estar adyacentes entre sí y en ocasiones pueden estar ubicados en ubicaciones opuestas en un ligando.

Por "ser capaz de unirse", como en el ejemplo de un ligando multimérico o heterodimérico que se une a una región de multimerización o región de unión a ligando, se entiende que el ligando se une a la región de unión a ligando, por ejemplo, una porción o porciones, del ligando se une a la región de multimerización y que esta unión puede detectarse mediante un método de ensayo que incluye, pero sin limitación, un ensayo biológico, un ensayo químico o medios de detección físicos, tales como, por ejemplo, cristalografía de rayos X. Además, cuando se considera que un ligando "no se une significativamente", se entiende que puede haber una detección menor de la unión de un ligando a la región de unión al ligando, pero que esta cantidad de unión o la estabilidad de la unión no es significativamente detectable y, cuando se produce en células como se describen en el presente documento, no activa a la célula modificada o provoca apoptosis. En ciertos ejemplos, cuando el ligando no "se une significativamente", tras la administración del ligando, la cantidad de células que sufren apoptosis es menor de un 10, 5, 4, 3, 2 o 1 %.

Las regiones de multimerización, tales como las regiones de multimerización de FRB o FKBP12, pueden estar ubicadas en posición amino-terminal respecto del polipéptido proapoptótico, pueden estar ubicadas en posición carboxilo-terminal respecto del polipéptido proapoptótico. Los polipéptidos adicionales, tales como, por ejemplo, polipéptidos enlazadores, polipéptidos de tallo, polipéptidos espaciadores o en algunos ejemplos, polipéptidos marcadores, pueden estar ubicados entre la región de multimerización y el polipéptido proapoptótico.

Por "región" o "dominio" se entiende un polipéptido o fragmento del mismo, que mantiene la función del polipéptido y está relacionado con los polipéptidos quiméricos de la presente solicitud. Esto es, por ejemplo, un dominio de unión a FKBP12, dominio de FKBP12, región de FKBP12, región de multimerización de FKBP12 y similares, se refieren a un polipéptido FKBP12 que se une al ligando de CID, tal como, por ejemplo, rimiducid o rapamicina, para provocar o posibilitar, la dimerización o multimerización del polipéptido quimérico. Por "región" o "dominio" de un polipéptido proapoptótico, por ejemplo, los polipéptidos de Caspasa-9 o polipéptidos de Caspasa-9 truncados de la presente divulgación, se entiende que tras la dimerización o multimerización de la región de Caspasa-9 como parte del polipéptido quimérico o el polipéptido proapoptótico quimérico, el polipéptido quimérico dimerizado o multimerizado puede participar en la cascada de caspasa, permitiendo o provocando, la apoptosis.

También pueden usarse variantes de FKBP12 en las regiones de multimerización de FKBP12 o FRB. Los ejemplos de variantes de FKBP12 incluyen aquellos de diversas especies, incluyendo, por ejemplo, levaduras. La variante de FKBP12 puede ser FKBP12.6 (calstabina).

Se contemplan otros heterodímeros en la presente solicitud. Puede usarse un polipéptido o región de calcineurina-A en lugar de la región de multimerización de FRB. El primer ligando puede comprender, por ejemplo, ciclosporina.

Como se usa en el presente documento, el término molécula, polipéptido o proteína de "iCaspasa-9", se define como una Caspasa-9 inducible. El término "iCaspasa-9" abarca ácidos nucleicos de iCaspasa-9, polipéptidos de iCaspasa-9 y/o vectores de expresión de iCaspasa-9. El término también abarca nucleótidos o secuencias de aminoácidos de iCaspasa-9 o una secuencia truncada que carece del dominio CARD.

Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de iCaspasa 1", "molécula de iCaspasa 3" o "molécula de iCaspasa 8" se define como una Caspasa 1, 3 u 8 inducible, respectivamente. El término iCaspasa 1, iCaspasa 3 o iCaspasa 8, abarca ácidos nucleicos de iCaspasa 1, 3 u 8, polipéptidos de iCaspasa 1, 3 u 8 y/o vectores de expresión de iCaspasa 1, 3 u 8, respectivamente. El término también abarca la secuencia de nucleótidos o aminoácidos natural de iCaspasa-1, -3 u -8, respectivamente o una secuencia truncada que carece del dominio CARD. Por Caspasa-9 de "tipo silvestre", en el contexto de los detalles experimentales proporcionados en el presente documento, se entiende la molécula de Caspasa-9 que carece del dominio CARD.

Los polipéptidos de Caspasa-9 modificados comprenden al menos una sustitución de aminoácidos que afecta a la actividad basal o a la CI_{50}, en un polipéptido quimérico que comprende el polipéptido de Caspasa-9 modificado. En el presente documento se analizan métodos para evaluar la actividad basal y la CI_{50}. Los polipéptidos de Caspasa-9 no modificados no comprenden este tipo de sustitución de aminoácidos. Los polipéptidos de Caspasa-9 tanto modificados como no modificados pueden estar truncados, por ejemplo, para eliminar el dominio CARD.

Las "variantes de función conservativa" son proteínas o enzimas en las que se ha cambiado un residuo de aminoácido concreto sin alterar la conformación general y la función de la proteína o enzima, incluyendo, pero sin limitación, el reemplazo de un aminoácido con uno que tenga propiedades similares, incluyendo carácter polar o no polar, tamaño, forma y carga. Las sustituciones de aminoácidos conservativas para muchos de los aminoácidos no codificados genéticamente comúnmente conocidos son bien conocidas en la técnica. Pueden determinarse

sustituciones conservativas para otros aminoácidos no codificados basándose en sus propiedades físicas, en comparación con las propiedades de los aminoácidos codificados genéticamente.

Los aminoácidos distintos de los indicados como conservados pueden diferir en una proteína o enzima, de tal forma que puede variar el porcentaje de similitud de secuencia de proteína o aminoácidos entre dos proteínas cualquiera con una función similar y puede ser, por ejemplo, al menos el 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % y al menos un 95 %, según se determina de acuerdo con un esquema de alineamiento. Como se cita en el presente documento, "similitud de secuencia" significa el grado de relación entre secuencias de nucleótidos o proteínas. El grado de similitud entre dos secuencias puede estar basado en el porcentaje de identidad y/o conservación de secuencia. En el presente documento, "identidad de secuencia" significa el grado en que dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos son invariantes. "Alineamiento de secuencias" significa el proceso de alineamiento de dos o más secuencias para lograr niveles máximos de identidad (y en el caso de secuencias de aminoácidos, conservación) con el fin de evaluar el grado de similitud. Numerosos métodos para alinear secuencias y evaluar la similitud/identidad se conocen en la técnica, tales como, por ejemplo, el método Cluster, en donde la similitud se basa en el algoritmo MEGALIGN, así como BLASTN, BLASTP y FASTA. Cuando se usa cualquiera de estos programas, pueden seleccionarse configuraciones que dan como resultado la máxima similitud de secuencia.

Los números de residuo de aminoácido citados en el presente documento reflejan la posición de aminoácido en el polipéptido de Caspasa-9 no truncado y no modificado, por ejemplo, el de la SEQ ID NO: 9. La SEQ ID NO: 9 proporciona una secuencia de aminoácidos para el polipéptido de Caspasa-9 truncado, que no incluye el dominio CARD. Por lo tanto, la SEQ ID NO: 9 comienza en el residuo de aminoácido número 135 y termina en el residuo de aminoácido número 416, con referencia a la secuencia de aminoácidos de Caspasa-9 de longitud completa. Los expertos medios en la materia pueden alinear la secuencia con otras secuencias de polipéptidos de Caspasa-9 para, si se desea, correlacionar el número de residuo de aminoácido, por ejemplo, usando los métodos de alineamiento de secuencias analizados en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término "ADNc" pretende hacer referencia a un ADN preparado usando ARN mensajero (ARNm) como molde. La ventaja del uso de ADNc, en contraposición al ADN genómico o al ADN polimerizado a partir de un molde de ARN genómico no procesado o parcialmente procesado, es que el ADNc contiene principalmente secuencias codificantes de la proteína correspondiente. Hay ocasiones en las que se usa la secuencia genómica completa o parcial, tal como cuando se necesitan regiones no codificantes para una expresión óptima o cuando se van a dirigir regiones no codificantes, tales como intrones, en una estrategia antisentido.

Como se usa en el presente documento, la expresión "construcción de expresión" o "transgén" se define como cualquier tipo de construcción genética que contiene un ácido nucleico que codifica productos génicos en los que la totalidad o parte de la secuencia de ácido nucleico codificante que puede transcribirse puede insertarse en el vector. El transcrito se traduce en una proteína, pero no necesariamente. La expresión puede incluir tanto la transcripción de un gen como la traducción del ARNm en un producto génico. Asimismo, la expresión puede incluir únicamente la transcripción del ácido nucleico que codifica genes de interés. La expresión "construcción terapéutica" también puede usarse para hacer referencia a la construcción de expresión o el transgén. La construcción de expresión o el transgén puede usarse, por ejemplo, como terapia para tratar enfermedades o trastornos hiperproliferativos, tales como cáncer, por lo que la construcción de expresión o el transgén es una construcción terapéutica o una construcción profiláctica.

Como se usa en el presente documento, la expresión "vector de expresión" se refiere a un vector que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos parte de un producto génico que puede transcribirse. En algunos casos, las moléculas de ARN se traducen posteriormente en una proteína, polipéptido o péptido. En otros casos, estas secuencias no se traducen, por ejemplo, en la producción de moléculas antisentido o ribozimas. Los vectores de expresión pueden contener una variedad de secuencias de control, que se refieren a secuencias de ácido nucleico necesarias para la transcripción y posiblemente la traducción de una secuencia codificante ligada operativamente en un organismo hospedador particular. Además de las secuencias de control que rigen la transcripción y la traducción, los vectores y vectores de expresión pueden contener secuencias de ácido nucleico que también cumplen otras funciones y se analizan más adelante. Como se usa en el presente documento, la expresión "ex vivo" se refiere a "fuera" del organismo. Las expresiones "*ex vivo*" o "*in vitro*" pueden usarse indistintamente en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, la expresión "funcionalmente equivalente", relacionada con Caspasa-9 o Caspasa-9 truncada, por ejemplo, se refiere a un fragmento, variante o análogo de ácido nucleico de Caspasa-9, se refiere a un ácido nucleico que codifica un polipéptido de Caspasa-9 o a un polipéptido de Caspasa-9, que estimula una respuesta apoptótica. "Funcionalmente equivalente" se refiere, por ejemplo, a un polipéptido de Caspasa-9 que carece del dominio CARD, pero tiene la capacidad de inducir una respuesta celular apoptótica. Cuando se aplica la expresión "funcionalmente equivalente" a otros ácidos nucleicos o polipéptidos, tal como, por ejemplo, CD19, el 5'LTR, la región de unión a ligando multimérico o CD3, se refiere a fragmentos, variantes y similares que tienen la misma actividad o una similar a la de los polipéptidos de referencia de los métodos del presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término "gen" se define como una proteína, un polipéptido o una unidad

codificante de péptido funcional. Como se comprenderá, este término funcional incluye secuencias genómicas, secuencias de ADNc y segmentos génicos modificados más pequeños que expresan o se adaptan para expresar, proteínas, polipéptidos, dominios, péptidos, proteínas de fusión y mutantes.

La expresión "enfermedad hiperproliferativa" se define como una enfermedad que surge de la hiperproliferación de células. Las enfermedades hiperproliferativas ejemplares incluyen, pero sin limitación, cáncer o enfermedades autoinmunitarias. Otras enfermedades hiperproliferativas pueden incluir oclusiones vasculares, reestenosis, ateroesclerosis o enfermedad inflamatoria del intestino.

La expresión "composición inmunogénica" o "inmunógeno" se refiere a una sustancia que tiene la capacidad de provocar una respuesta inmunitaria. Los ejemplos de inmunógenos incluyen, por ejemplo, antígenos, autoantígenos que desempeñan un papel en la inducción de enfermedades autoinmunitarias y antígenos asociados con tumores expresados en células cancerosas.

El término "inmunocomprometido", como se usa en el presente documento, se define como un sujeto que tiene un sistema inmunitario reducido o debilitado. La condición inmunocomprometida puede deberse a un defecto o disfunción del sistema inmunitario o a otros factores que aumentan la susceptibilidad a infecciones y/o enfermedades. Aunque dicha categorización permite una base conceptual para la evaluación, los individuos inmunocomprometidos normalmente no encajan completamente en un grupo o el otro. Puede verse afectado más de un defecto en los mecanismos de defensa del organismo. Por ejemplo, los individuos con un defecto específico en linfocitos T provocado por el VIH también pueden tener neutropenia provocada por los fármacos usados para la terapia antivírica o estar inmunocomprometidos debido a una pérdida de integridad de la piel y las membranas mucosas. Un estado inmunocomprometido puede ser el resultado de vías centrales u otros tipos de discapacidad causada por el abuso de drogas por vía intravenosa; o puede estar causado por una neoplasia maligna secundaria, malnutrición o por haber estado infectado por otros agentes infecciosos, tales como tuberculosis o enfermedades de transmisión sexual, por ejemplo, sífilis o hepatitis.

Como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéutica o farmacológicamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y a composiciones que no producen reacciones adversas, alérgicas u otras no deseadas cuando se administran a un animal o un ser humano.

Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos, y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con los vectores o células presentados en el presente documento, se contempla su uso en composiciones terapéuticas. Pueden incorporarse principios activos complementarios en las composiciones.

Como se usa en el presente documento, el término "polinucleótido" se define como una cadena de nucleótidos. Además, los ácidos nucleicos son polímeros de nucleótidos. Por lo tanto, los ácidos nucleicos y polinucleótidos como se usan en el presente documento son intercambiables. Los ácidos nucleicos son polinucleótidos, que pueden hidrolizarse en los "nucleótidos" monoméricos. Los nucleótidos monoméricos pueden hidrolizarse en nucleósidos. Como se usa en el presente documento, los polinucleótidos incluyen, pero sin limitación, todas las secuencias de ácido nucleico que se obtienen por cualquier medio disponible en la técnica, incluyendo, sin limitación, medios recombinantes, es decir, la clonación de secuencias de ácido nucleico de una biblioteca recombinante o un genoma celular, usando tecnología de clonación convencional y PCR™ y similares y por medios sintéticos. Además, los polinucleótidos incluyen mutaciones de los polinucleótidos, incluyen, pero sin limitación, mutaciones de los nucleótidos o nucleósidos por métodos bien conocidos en la técnica. Un ácido nucleico puede comprender uno o más polinucleótidos.

Como se usa en el presente documento, el término "polipéptido" se define como una cadena de residuos de aminoácidos, que normalmente tiene una secuencia definida. Como se usa en el presente documento, el término polipéptido se usa indistintamente con los términos "péptidos" y "proteínas".

Como se usa en el presente documento, el término "promotor" se define como una secuencia de ADN reconocida por la maquinaria sintética de la célula o la maquinaria sintética introducida, requerida para iniciar la transcripción específica de un gen.

Los términos "transfección" y "transducción" son intercambiables y se refieren al proceso mediante el cual se introduce una secuencia de ADN exógeno en una célula hospedadora eucariota. La transfección (o transducción) puede lograrse mediante uno cualquiera de una serie de medios que incluyen electroporación, microinyección, administración por pistola génica, infección retrovírica, lipofección, superfección y similares.

Como se usa en el presente documento, el término "singénico" se refiere a células, tejidos o animales que tienen genotipos que son idénticos o están lo suficientemente relacionados para permitir el trasplante de tejidos o son inmunológicamente compatibles. Por ejemplo, gemelos idénticos o animales de la misma estirpe endógama.

Singénico e isogénico pueden usarse indistintamente.

Los términos "paciente" o "sujeto" son intercambiables y, como se usan en el presente documento, incluyen, pero sin limitación, un organismo o animal; un mamífero, incluyendo, por ejemplo, un ser humano, primate no humano (por ejemplo, mono), ratón, cerdo, vaca, cabra, conejo, rata, cobaya, hámster, caballo, mono, oveja u otro mamífero no humano; un no mamífero, incluyendo, por ejemplo, un vertebrado no mamífero, tal como un ave (por ejemplo, un pollo o pato) o un pez y un invertebrado no mamífero.

Por "molécula de activación de linfocitos T" se entiende un polipéptido que, cuando se incorpora en un linfocito T que expresa un receptor de antígeno quimérico, potencia la activación del linfocito T. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, moléculas que confieren señal 1 que contienen ITAM, tales como, por ejemplo, polipéptido de CD3 ζ y receptor gamma de Fc, tal como, por ejemplo, subunidad de receptor gamma de Fc épsilon (FcεR1γ) (Haynes, N.M., et al. J. Immunol. 166:182-7 (2001)). J. Immunology).

Como se usa en el presente documento, la expresión "bajo el control transcripcional" o "unido operativamente" se define como el promotor que se encuentra en la ubicación y orientación correctas en relación con el ácido nucleico para controlar la iniciación de la ARN polimerasa y la expresión del gen.

Como se usa en el presente documento, los términos "tratamiento", "tratar", "tratado" o "tratando" se refieren a la profilaxis y/o terapia.

Como se usa en el presente documento, el término "vacuna" se refiere a una formulación que contiene una composición presentada en el presente documento que se encuentra en una forma que puede administrarse a un animal. Típicamente, la vacuna comprende un medio de solución acuosa salina o tamponada convencional en la que se suspende o disuelve la composición. En esta forma, la composición puede usarse convenientemente para prevenir, mejorar o de otro modo tratar una afección. Tras su introducción en un sujeto, la vacuna es capaz de provocar una respuesta inmunitaria que incluye, pero sin limitación, la producción de anticuerpos, citoquinas y/u otras respuestas celulares.

El ácido nucleico puede estar contenido en un vector vírico. El vector vírico puede ser un vector retrovírico. El vector vírico puede ser un vector adenovírico o un vector lentivírico. Se entiende que la célula presentadora de antígenos se pone en contacto con el vector vírico *ex vivo* y la célula presentadora de antígenos se pone en contacto con el vector vírico *in vivo*.

Células madre hematopoyéticas y terapia celular

Las células madre hematopoyéticas incluyen células progenitoras hematopoyéticas, células multipotentes e inmaduras que pueden diferenciarse en tipos celulares sanguíneos maduros. Estas células madre y células progenitoras pueden aislarse de médula ósea y de sangre de cordón umbilical y, en algunos casos, de sangre periférica. Otras células madre y progenitoras incluyen, por ejemplo, células estromales mesenquimales, células madre embrionarias y células madre pluripotentes inducibles.

Las células estromales mesenquimales (MSC) procedentes de médula ósea se han definido como una fracción de células mononucleares de médula ósea que se adhieren a placas de cultivo plásticas en condiciones de cultivo convencionales, son negativas para marcadores de linaje hematopoyético y positivas para CD73, CD90 y CD105 y son capaces de diferenciarse *in vitro* en adipocitos, osteoblastos y condroblastos. Aunque se supone que un papel fisiológico es el soporte de la hematopoyesis, varios informes también han determinado que las MSC son capaces de incorporarse y posiblemente proliferar en áreas de crecimiento activo, tales como tejidos cicatriciales y neoplásicos y de alojarse en su microambiente nativo y reemplazar la función de las células enfermas. Su potencial de diferenciación y capacidad de alojamiento hace que las MSC sean vehículos atractivos para la terapia celular, ya sea en su forma nativa para aplicaciones regenerativas o mediante su modificación genética para el suministro de agentes biológicos activos a microambientes específicos, tales como la médula ósea enferma o depósitos metastásicos. Además, las MSC poseen una potente actividad inmunosupresora intrínseca y hasta la fecha su aplicación más frecuente ha sido en el tratamiento experimental de la enfermedad de injerto contra hospedador y de trastornos autoinmunitarios (Pittenger, M. F., et al. (1999). Science 284: 143-147; Dominici, M., et al. (2006). Cytotherapy 8: 315-317; Prockop, D. J. (1997). Science 276: 71-74; Lee, R. H., et al. (2006). Proc Natl Acad Sci U S A 103: 17438-17443; Studeny, M., et al., (2002). Cancer Res 62: 3603-3608; Studeny, M., et al. (2004). J Natl Cancer Inst 96: 1593-1603; Horwitz, E. M., et al. (1999). Nat Med 5: 309-313; Chamberlain, G., et al., (2007). Stem Cells 25: 2739-2749; Phinney, D. G. y Prockop, D. J. (2007). Stem Cells 25: 2896-2902; Horwitz, E. M., et al. (2002). Proc Natl Acad Sci U S A 99: 8932-8937; Hall, B., et al., (2007). Int J Hematol 86: 8-16; Nauta, A. J. y Fibbe, W. E. (2007). Blood 110: 3499-3506; Le Blanc, K., et al. (2008). Lancet 371: 1579-1586; Tyndall, A. y Uccelli, A. (2009). Bone Marrow Transplant).

Se han infundido MSC en cientos de pacientes con efectos secundarios mínimos reportados. Sin embargo, el seguimiento es limitado, se desconocen los efectos secundarios a largo plazo y se sabe poco de las consecuencias que se asociarán con los esfuerzos futuros para inducir su diferenciación *in vivo*, por ejemplo, en el cartílago o hueso

o para modificarlas genéticamente para potenciar su funcionalidad. Varios modelos animales han suscitado preocupaciones acerca de su seguridad. Por ejemplo, se ha observado formación espontánea de osteosarcoma en MSC de origen murino. Además, se han analizado focos de osificación y calcificación ectópicos en modelos de rata y ratón de infarto de miocardio tras la inyección local de MSC y también se ha hecho evidente su potencial proarrítmico en experimentos de cocultivo con miocitos ventriculares de rata neonata. Además, se ha observado osificación pulmonar bilateral difusa después del trasplante de médula ósea en un perro, posiblemente debido a los componentes estromales trasplantados (Horwitz, E. M., et al., (2007). Biol Blood Marrow Transplant 13: 53-57; Tolar, J., et al. (2007). Stem Cells 25: 371-379; Yoon, Y.-S., et al., (2004). Circulation 109: 3154-3157; Breitbach, M., et al. (2007). Blood 110: 1362-1369; Chang, M. G., et al. (2006). Circulation 113: 1832-1841; Sale, G. E. y Storb, R. (1983). Exp Hematol 11: 961-966).

En otro ejemplo de terapia celular, se han administrado linfocitos T con un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico a pacientes para tratar el cáncer (Zhong, X.-S., (2010) Molecular Therapy 18:413-420). Los receptores de antígeno quiméricos (CAR) son receptores artificiales diseñados para transmitir especificidad de antígeno a los linfocitos T sin la necesidad de presentación de antígenos del MHC. Incluyen un componente específico de antígeno, un componente transmembrana y un componente intracelular seleccionado para activar al linfocito T y proporcionar inmunidad específica. Los linfocitos T que expresan receptores de antígeno quiméricos pueden usarse en diversas terapias, incluyendo terapias para el cáncer. Pueden usarse polipéptidos coestimuladores para potenciar la activación de linfocitos T que expresan CAR contra antígenos diana y de este modo, aumentar la potencia de la inmunoterapia adoptiva.

Por ejemplo, se han usado linfocitos T que expresan un receptor de antígeno quimérico basado en el anticuerpo monoclonal humanizado Trastuzumab (Herceptin) para tratar a pacientes con cáncer. Los eventos adversos son posibles, aunque, en al menos un caso comunicado, la terapia tuvo consecuencias fatales para el paciente (Morgan, R.A., et al., (2010) Molecular Therapy 18:843-851). La transducción de células con un interruptor de seguridad basado en Caspasa-9 quimérico como se presenta en el presente documento, podría proporcionar un interruptor de seguridad que podría detener la progresión del evento adverso. Por lo tanto, en el presente documento también se describen ácidos nucleicos, células y métodos en donde el linfocito T modificado también expresa un polipéptido de Caspasa-9 inducible. En caso de necesidad, por ejemplo, de reducir el número de linfocitos T modificados con receptor de antígeno quimérico, puede administrarse al paciente un ligando inducible, induciendo de este modo la apoptosis de los linfocitos T modificados.

La eficacia antitumoral de la inmunoterapia con linfocitos T modificados para expresar receptores de antígeno quimérico (CAR) ha mejorado progresivamente a medida que las moléculas de CAR han incorporado dominios de señalización adicionales para aumentar su potencia. Los linfocitos T transducidos con CAR de primera generación, que contenían únicamente la molécula de señalización intracelular CD3ζ, han demostrado una escasa persistencia y expansión *in vivo* después de la transferencia adoptiva (Till BG, Jensen MC, Wang J, et al: CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: pilot clinical trial results. Blood 119:3940-50, 2012; Pule MA, Savoldo B, Myers GD, et al: Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. Nat Med 14:1264-70, 2008; Kershaw MH, Westwood JA, Parker LL, et al: A phase 1 study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. Clin Cancer Res 12:6106-15, 2006), ya que las células tumorales normalmente carecen de las moléculas coestimuladoras necesarias para completar la activación de linfocitos T. Los linfocitos CAR T de segunda generación se diseñaron para mejorar la proliferación y supervivencia de las células. Los linfocitos CAR T de segunda generación que incorporan los dominios coestimulantes intracelulares de CD28 o 4-1BB (Carpenito C, Milone MC, Hassan R, et al: Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. Proc Natl Acad Sci U S A 106:3360-5, 2009; Song DG, Ye Q, Poussin M, et al: CD27 costimulation augments the survival and antitumor activity of redirected human T cells *in vivo*. Blood 119:696-706, 2012), muestran una supervivencia mejorada y expansión *in vivo* después de la transferencia adoptiva y ensayos clínicos más recuentes usando linfocitos T modificados con CAR anti-CD19 que contenían estas moléculas coestimulantes han demostrado una eficacia notable para el tratamiento de la leucemia $CD19^+$ (Kalos M, Levine BL, Porter DL, et al: T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. Sci Transl Med 3:95ra73, 2011; Porter DL, Levine BL, Kalos M, et al: Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. N Engl J Med 365:725-33, 2011; Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, et al: CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. Sci Transl Med 5:177ra38, 2013).

Aunque otros han explorado moléculas de señalización adicionales procedentes de proteínas de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF), tales como OX40 y 4-1BB, denominadas linfocitos CAR T de "tercera generación", (Finney HM, Akbar AN, Lawson AD: Activation of resting human primary T cells with chimeric receptors: costimulation from CD28, inducible costimulator, CD134, and CD137 in series with signals from the TCR zeta chain. J Immunol 172:104-13, 2004; Guedan S, Chen X, Madar A, et al: ICOS-based chimeric antigen receptors program bipolar TH17/TH1 cells. Blood, 2014), otras moléculas que inducen la señalización de linfocitos T distintas del factor nuclear CD3ζ de la vía del factor de linfocitos T activados (NFAT) pueden proporcionar la coestimulación necesaria para la supervivencia y proliferación de linfocitos T y posiblemente proporcionan linfocitos CAR T con funciones adicionales valiosas, no proporcionadas por moléculas coestimuladoras más convencionales. Algunos linfocitos CAR T de

segunda y tercera generación se han relacionado con muertes de pacientes, debido a la tormenta de citoquinas y al síndrome de lisis tumoral provocado por los linfocitos T altamente activados.

Por "receptor de antígeno quimérico" o "CAR" se entiende, por ejemplo, un polipéptido quimérico que comprende una secuencia de polipéptido que reconoce un antígeno diana (un dominio de reconocimiento de antígeno) ligado a un polipéptido transmembrana y un polipéptido de dominio intracelular seleccionado para activar el linfocito T y proporcionar inmunidad específica. El dominio de reconocimiento de antígeno puede ser un fragmento variable monocatenario (scFv) o puede, por ejemplo, obtenerse de otras moléculas, tales como, por ejemplo, un receptor de linfocitos T o receptor de reconocimiento de patrones. El dominio intracelular comprende al menos un polipéptido que provoca la activación del linfocito T, tal como, por ejemplo, pero sin limitación, CD3 zeta y, por ejemplo, moléculas coestimuladoras, por ejemplo, pero sin limitación, CD28, OX40 y 4-1BB. La expresión "receptor de antígeno quimérico" también puede citarse como receptores quiméricos que no proceden de anticuerpos, pero son receptores de linfocitos T quiméricos. Estos receptores de linfocitos T quiméricos pueden comprender una secuencia de polipéptido que reconoce a un antígeno diana, donde la secuencia de reconocimiento puede ser, por ejemplo, pero sin limitación, la secuencia de reconocimiento procedente de un receptor de linfocitos T o un scFv. Los polipéptidos de dominio intracelular son aquellos que actúan para activar al linfocito T. Los receptores de linfocitos T quiméricos se analizan en, por ejemplo, Gross, G. y Eshar, Z., FASEB Journal 6:3370-3378 (1992) y Zhang, Y., et al., PLOS Pathogens 6:1-13 (2010).

En un tipo de receptor de antígeno quimérico (CAR), se fusionan las cadenas variables pesadas (VH) y ligeras (VL) de un anticuerpo monoclonal específico para tumores en fase con la cadena de CD3 zeta (ζ) del complejo de receptor de linfocitos T. Los VH y VL generalmente se conectan entre sí usando un enlazador de glicina-serina flexible y después se une al dominio transmembrana por un espaciador (CH2CH3) para extender el scFv más allá de la superficie celular, de tal forma que puede interactuar con antígenos tumorales. Después de la transducción, los linfocitos T ahora expresan el CAR en su superficie y tras entrar en contacto y su ligamiento con un antígeno tumoral, señalizan a través de la cadena de CD3 zeta, induciendo citotoxicidad y activación celular.

Los investigadores han observado que la activación de linfocitos T a través de CD3 zeta es suficiente para inducir una eliminación específica de tumor, pero es insuficiente para inducir la proliferación y la supervivencia de linfocitos T. Los ensayos clínicos tempranos usando linfocitos T modificados con CAR de primera generación que expresan solo la cadena zeta mostraron que los linfocitos T modificados genéticamente tenían una escasa supervivencia y proliferación *in vivo*.

Debido a que es necesaria la coestimulación a través del eje B7 para la activación completa de linfocitos T, los investigadores añadieron el dominio de señalización del polipéptido coestimulante CD28 a la construcción de CAR. Esta región contiene generalmente la región transmembrana (en lugar de la versión de CD3 zeta) y el motivo YMNM para la unión a PI3K y Lck. Las comparaciones *in vivo* entre linfocitos T que expresan CAR con solo zeta o CAR con tanto zeta como CD28 demostraron que CD28 potenció la expansión *in vivo*, en parte debido a la producción aumentada de IL-2 después de la activación. La inclusión de CD28 se denomina CAR de 2.ª generación. Las moléculas coestimulantes más comúnmente usadas incluyen CD28 y 4-1BB, que, después del reconocimiento del tumor, pueden iniciar una cascada de señalización que da como resultado la activación de NF-κB, que promueve tanto la proliferación de linfocitos T y la supervivencia celular.

El uso de los polipéptidos coestimulantes 4-1BB u OX40 en el diseño del CAR ha mejorado adicionalmente la supervivencia y la eficacia de linfocitos T. En particular, 4-1BB parece potenciar en gran medida la proliferación y supervivencia de linfocitos T. Este diseño de 3.ª generación (con 3 dominios de señalización) se ha usado en CAR de PSMA (Zhong XS, et al., Mol Ther. febrero de 2010; 18(2):413-20) y en CAR de CD19, más notablemente para el tratamiento de la CLL (Milone, M.C., et al., (2009) Mol. Ther. 17:1453-1464; Kalos, M., et al., Sci. Transl. Med. (2011) 3:95ra73; Porter, D., et al., (2011) N. Engl. J. Med. 365: 725-533). Estas células mostraron una función sorprendente en 3 pacientes, expandiéndose más de 1000 veces *in vivo* y dieron como resultado una remisión sostenida en los tres pacientes.

Se entiende que por "derivado" se hace referencia a que la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos puede obtenerse de la secuencia de la molécula. El dominio intracelular comprende al menos un polipéptido que provoca la activación del linfocito T, tal como, por ejemplo, pero sin limitación, CD3 zeta y, por ejemplo, moléculas coestimuladoras, por ejemplo, pero sin limitación, CD28, OX40 y 4-1BB.

Los receptores de linfocitos T son moléculas formadas por dos polipéptidos diferentes que se encuentran en la superficie de los linfocitos T. Reconocen a antígenos unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad; tras el reconocimiento del antígeno, el linfocito T queda activado. Por "reconocer" se entiende, por ejemplo, que el receptor de linfocitos T o el fragmento o fragmentos de los mismos, tales como el polipéptido de TCRα y TCRβ juntos, es capaz de entrar en contacto con el antígeno e identificarlo como una diana. Los TCR pueden comprender polipéptidos o cadenas α y β. Los polipéptidos α y β incluyen dos dominios extracelulares, los dominios variables y constantes. El dominio variable de los polipéptidos α y β tiene tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR); la CDR3 se considera la CDR responsable principal del reconocimiento del epítopo. El polipéptido α incluye las regiones V y J, generadas por la recombinación de VJ y el polipéptido β incluye las regiones V, D y J, generadas

por la recombinación de VDJ. La intersección de las regiones VJ y las regiones VDJ corresponde a la región CDR3. Los TCR normalmente se nombran usando la nomenclatura de TCR de International Immunogenetics (IMGT) (base de datos IMGT, www.imgt.org; Giudicelli, V., et al., IMGT/IIGM-DB, the IMGT® comprehensive database of immunoglobulin and T cell receptor nucleotide sequences, Nucl. Acids Res., 34, D781-D784 (2006). PMID: 16381979; T cell Receptor Factsbook, LeFranc y LeFranc, Academic Press ISBN 0-12-441352-8).

Los receptores de linfocitos T quiméricos pueden unirse a, por ejemplo, polipéptidos antigénicos, tales como Bob-1, PRAME y NY-ESO-1. (Solicitud de Patente de los Estados Unidos n.º 14/930.572, presentada el 2 de noviembre de 2015, titulada "T Cell Receptors Directed Against Bob1 and Uses Thereof," y Solicitud Provisional de Patente de los Estados Unidos n.º 62/130.884, presentada el 10 de marzo de 2015, titulada "T Cell Receptors Directed Against the Preferentially-Expressed Antigen of Melanoma and Uses Thereof".

En otro ejemplo de terapia celular, se modifican linfocitos T de tal forma que expresan un receptor de TGF-beta no funcional, haciendo que sean resistentes a TGF-beta. Esto permite que las células modificadas eviten la citotoxicidad provocada por TGF-beta y permite el uso de las células en terapia celular (Bollard, C.J., et al., (2002) Blood 99:3179-3187; Bollard, C.M., et al., (2004) J. Exptl. Med. 200:1623-1633). Sin embargo, también puede dar como resultado un linfoma de linfocitos T u otros efectos adversos, ya que los linfocitos T modificados carecen de parte del control celular normal; estos linfocitos T terapéuticos podrían volverse de por sí malignos. La transducción de estos linfocitos T modificados con un interruptor de seguridad a base de Caspasa-9 quimérico como se presenta en el presente documento, podría proporcionar un interruptor de seguridad que podría evitar este resultado.

En otros ejemplos, se modifican linfocitos citolíticos naturales para que expresen el polipéptido de direccionamiento a membrana. En lugar de un receptor de antígeno quimérico, el polipéptido unido a membrana heterólogo puede ser un receptor de NKG2D. Los receptores de NKG2D pueden unirse a proteínas de estrés (por ejemplo, MICA/B) en células tumorales y de este modo pueden activar a las células NK. También puede fusionarse el dominio de unión extracelular a dominios de señalización (Barber, A., et al., Cancer Res 2007;67: 5003-8; Barber A, et al., Exp Hematol. 2008; 36:1318-28; Zhang T., et al., Cancer Res. 2007; 67:11029-36. y este podría, a su vez, unirse a dominios FRB, análogos a los CAR enlazados a FRB. Además, pueden usarse otros receptores de la superficie celular, tales como VEGF-R como sitios de acoplamiento para dominios FRB para potenciar el agrupamiento dependiente de tumor en presencia de VEGF provocado por hipoxia, encontrado a altos niveles en muchos tumores.

Las células usadas en terapia celular, que expresan un gen heterólogo, tal como un receptor modificado o un receptor quimérico, pueden transducirse con ácido nucleico que codifica un interruptor de seguridad quimérico a base de Caspasa-9 antes, después o al mismo tiempo que, se transducen las células con el gen heterólogo.

Trasplante de células madre haploidénticas

Aunque el trasplante de células madre ha demostrado ser un medio eficaz para tratar una gran variedad de enfermedades que implican a células madre y su descendencia, la escasez de donantes histocompatibles ha demostrado ser uno de los principales impedimentos para una aplicación más amplia de la estrategia. La introducción de grandes paneles de donantes de células madre no relacionados y de bancos de sangre del cordón ha ayudado a aliviar el problema, pero muchos pacientes siguen sin ser adecuados para ninguna de las dos fuentes. Incluso cuando puede encontrarse un donante emparejado, el tiempo transcurrido entre que se comienza la búsqueda hasta que se recogen las células madre normalmente supera los tres meses, un retraso que puede condenar a muchos de los pacientes más necesitados. Por lo tanto, ha habido un interés considerable en aprovechar donantes de familia HLA haploidénticos. Dichos donantes pueden ser parientes, hermanos o familiares de segundo grado. El problema del rechazo de injertos puede superarse mediante una combinación de condicionamiento adecuado y altas dosis de células madre, mientras que la enfermedad del injerto contra hospedador (GvHD) puede prevenirse mediante el empobrecimiento extensivo de linfocitos T en el injerto donante. Los resultados inmediatos de dichos procedimientos han sido gratificantes, con una frecuencia de injerto > 90 % y una tasa de GvHD grave < 10 % tanto para adultos como para niños, incluso en ausencia de inmunosupresión después del trasplante. Desafortunadamente, la profunda inmunosupresión del procedimiento de injerto, acoplado con el empobrecimiento extenso de linfocitos T y el desemparejamiento de HLA entre el donante y el receptor da lugar a una tasa extremadamente elevada de complicaciones infecciosas después del trasplante y contribuyó a la alta incidencia de recidiva de la enfermedad.

La infusión de linfocitos T donantes es una estrategia eficaz para conferir inmunidad antivírica y antitumoral después del trasplante de células madre alogénicas. La simple reposición de linfocitos T a los pacientes después de un trasplante haploidéntico, sin embargo, no puede funcionar; la frecuencia de linfocitos T alorreactivos es varios órdenes de magnitud mayor que la frecuencia de, por ejemplo, linfocitos T específicos de virus. Se están desarrollando métodos para acelerar la reconstitución inmunitaria mediante la administración de linfocitos T donantes que en primer lugar se han empobrecido de células alorreactivas. Un método para lograr esto es estimulando linfocitos T donantes con líneas celulares linfoblastoides B transformadas con EBV (LCL). Los linfocitos T alorreactivos regulan positivamente la expresión de CD25 y se eliminan por un conjugado de mAb para CD25-inmunotoxina, RFT5-SMPT-dgA. Este compuesto consiste en una IgG1 murina anti-CD25 (cadena alfa del receptor de IL-2) conjugado a través de un reticulante heterobifuncional [N-succinimidiloxicarbonil-alfa-metil-d-(2-

piridiltio)tolueno] a la cadena A de ricina químicamente desglucosilada (dgA).

El tratamiento con inmunotoxina CD25 después de la estimulación con LCL elimina >90 % de las células alorreactivas. En un estudio clínico de fase 1, se usó inmunotoxina CD25 para eliminar linfocitos alorreactivos y reconstitución inmunitaria después de infundirse los linfocitos T donantes aloempobrecidos a 2 niveles de dosis en receptores de SCT haploidénticos empobrecidos en linfocitos T. Se trató a ocho pacientes a 10^4 células/kg/dosis y 8 pacientes recibieron 10^5 células/kg/dosis. Los pacientes que recibieron 10^5 células/kg/dosis mostraron una recuperación de linfocitos T significativamente mejorada a los 3, 4 y 5 meses después del SCT en comparación con los que recibieron 10^4 células/kg/dosis ($P < 0,05$). La recuperación acelerada de los linfocitos T se produjo como resultado de la expansión de la población efectora de memoria (CD45RA(-)CCR-7(-)) ($P < 0,05$), lo que sugiere que es probable que las respuestas de linfocitos T sean de larga duración. No se detectaron círculos de escisión del receptor de linfocitos T (TREC) al reconstituir linfocitos T en pacientes del nivel 2 de dosis, lo que indica que es probable que procedan de las células aloempobrecidas infundidas. El tipado espectrométrico de los linfocitos T a los 4 meses demostró un repertorio Vbeta policlonal. Usando ensayos de tetrámero y de inmunopuntos ligados a enzimas (ELISpot), se observaron respuestas específicas para citomegalovirus (CMV) y virus de Epstein Barr (EBV) en 4 de los 6 pacientes evaluables al nivel de dosis 2 tan pronto como a los 2 a 4 meses después del trasplante, mientras que dichas respuestas no se observaron hasta los 6 a 12 meses en los pacientes del nivel de dosis 1. La incidencia de enfermedad de injerto contra hospedador aguda (2 de 16) y crónica (GvHD; 2 de 15) fue baja. Estos datos demuestran que los linfocitos T aloempobrecidos pueden usarse con seguridad para mejorar la recuperación de linfocitos T tras un SCT haploidéntico. La cantidad de células infundidas se escaló posteriormente a 10^6 células/kg sin evidencia de GvHD.

Aunque esta estrategia reconstituyó la inmunidad antivírica, la recidiva siguió siendo un problema importante y 6 pacientes trasplantados por leucemia de alto riesgo tuvieron una recidiva y fallecieron a causa de la enfermedad. Por lo tanto, son útiles dosis mayores de linfocitos T para reconstituir la inmunidad antitumoral y para proporcionar el efecto antitumoral deseado, ya que la frecuencia estimada de precursores reactivos con el tumor es de 1 a 2 log menor que la frecuencia de precursores reactivos con el virus. Sin embargo, en algunos pacientes, estas dosis de células serán suficientes para provocar la GvHD incluso después del aloempobrecimiento (Hurley CK, et al., Biol Blood Marrow Transplant 2003;9:610-615; Dey BR, et al., Br.J Haematol. 2006;135:423-437; Aversa F, et al., N Engl J Med 1998;339:1186-1193; Aversa F, et al., J C lin.On col. 2005;23:3447-3454; Lang P, Mol.Dis. 2004;33:281-287; Kolb HJ, et al., Blood 2004;103:767-776; Gottschalk S, et al., Annu.Rev.Med 2005;56:29-44; Bleakley M, et al., Nat.Rev.Cancer 2004;4:371-380; Andre-Schmutz I, et al., Lancet 2002;360:130-137; Solomon SR, et al., Blood 2005;106:1123-1129; Amrolia PJ, et al., Blood 2006;108:1797-1808; Amrolia PJ, et al., Blood 2003; Ghetie V, et al., J Immunol Methods 1991;142:223-230; Molldrem JJ, et al., Cancer Res 1999;59:2675-2681; Rezvani K, et al., Clin. Cancer Res. 2005;1 1:8799-8807; Rezvani K, et al., Blood 2003;102:2892-2900).

Enfermedad de injerto contra hospedador (GvHD)

La enfermedad de injerto contra hospedador es una afección que en ocasiones se produce tras el trasplante de células donantes inmunocompetentes, por ejemplo, linfocitos T, en un receptor. Las células trasplantadas reconocen las células del receptor como extrañas y las atacan y destruyen. Esta afección puede ser un peligroso efecto del trasplante de linfocitos T, especialmente cuando se asocia con el trasplante de células madre haploidénticas. Es necesario infundir suficientes linfocitos T para proporcionar los efectos beneficiosos, tales como, por ejemplo, la reconstitución de un sistema inmunitario y el efecto antitumoral del injerto. Pero, el número de linfocitos T que puede trasplantarse puede estar limitado por la preocupación de que el trasplante de como resultado una enfermedad de injerto contra hospedador grave.

La enfermedad de injerto contra hospedador puede clasificarse en estadios como se indica en las tablas a continuación:

Clasificación del estadio

	Estadio 0	**Estadio 1**	**Estadio 2**	**Estadio 3**	**Estadio 4**
Piel	Sin erupción	Erupción <25 % BSA	25-50 %	>50 % Eritrodermia generalizada	Más bullas y descamación
Intestino (para pacientes pediátricos)	<500 ml diarrea/día	501-1000 ml/día 5cc/kg-10 cc/kg/día	1001-1500 ml/día 10cc/kg-15cc/kg/día	>1500 ml/día >15 cc/kg/día	Dolor abdominal grave e íleon
UGI		Náuseas/vómitos graves			
Hígado	Bilirrubina s 2 mg/dl	2,1-3 mg/dl	3,1-6 mg/dl	6,1-15 mg/dl	>15 mg/dl

La determinación del grado de la GvHD aguda puede llevarse a cabo mediante los criterios de la conferencia de consenso (Przepiorka D et al., 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. Bone Marrow Transplant 1995;15:825-828).

Índice de graduación de la GvHD aguda

	Piel	**Hígado**	**Intestino**	**GI superior**
0	Ninguno y	Ninguno y	Ninguno y	Ninguno
I	Estadio 1-2 y	Ninguno y	Ninguno	Ninguno
II	Estadio 3 y/o	Estadio 1 y/o	Estadio 1 y/o	Estadio 1
III	Ninguno-Estadio 3 con	Estadio 2-3 o	Estadio 2-4	N/A
IV	Estadio 4 o	Estadio 4	N/A	N/A

Caspasa-9 inducible como "interruptor de seguridad" para la terapia celular y para el trasplante de células modificadas por ingeniería genética

Por reducir el efecto de la enfermedad de injerto contra hospedador se entiende, por ejemplo, una reducción en los síntomas de la GvHD, de tal forma que puede asignarse al paciente un estadio menor o, por ejemplo, una reducción de un síntoma de la enfermedad de injerto contra hospedador de al menos un 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95% o 99%. También puede medirse una reducción en el efecto de la enfermedad de injerto contra hospedador mediante la detección de una reducción en los linfocitos T activados en la reacción de la GvHD, tal como, por ejemplo, una reducción de las células que expresan la proteína marcadora, por ejemplo CD19 y expresan CD3 (células $CD3^+$ $CD19^+$, por ejemplo) en al menos un 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95% o 99%.

En el presente documento se proporciona una estrategia de gen de suicidio alternativa que está basada en moléculas proapoptóticas humanas fusionadas con una variante de FKBP que está optimizada para unirse a un inductor químico de la dimerización (CID). Las variantes pueden incluir, por ejemplo, una región FKBP que tiene una sustitución de aminoácidos en la posición 36 seleccionada entre el grupo que consiste en valina, leucina, isoleucina y alanina (Clackson T, et al., Proc Natl Acad Sci USA. 1998, 95:10437-10442). AP1903 es una molécula sintética que ha demostrado ser segura en voluntarios sanos (Iuliucci JD, et al., J Clin Pharmacol. 2001, 41:870-879). La administración de esta molécula pequeña da como resultado la reticulación y activación de las moléculas diana proapoptóticas. Se ha explorado la aplicación de este sistema inducible en linfocitos T humanos usando Fas o el dominio efector de muerte (DED) de la proteína que contiene dominio de muerte asociado con Fas (FADD) como moléculas proapoptóticas. Hasta un 90 % de los linfocitos T transducidos con estas moléculas de muerte inducible sufren apoptosis después de la administración de CID (Thomis DC, et al., Blood. 2001, 97:1249-1257; Spencer DM, et al., Curr Biol. 1996, 6: 839-847; Fan L, et al., Hum Gene Ther. 1999, 10: 2273-2285; Berger C, et al., Blood. 2004, 103:1261-1269; Junker K, et al., Gene Ther. 2003, 10:1189-197). Puede usarse esta estrategia de gen de suicidio en cualquier célula adecuada usada para terapia celular, incluyendo, por ejemplo, células madre hematopoyéticas y otras células progenitoras, incluyendo, por ejemplo, células estromales mesenquimales, células madre embrionarias y células madre pluripotentes inducibles. AP20187 y AP1950, una versión sintética de AP1903, también pueden usarse como el ligando inductor. (Amara JF (97) PNAS 94:10618-23; Clontech Laboratories-Takara Bio)

Por lo tanto, este interruptor de seguridad, catalizado por Caspasa-9, puede usarse en casos donde hay una afección en el paciente bajo terapia celular que requiere la eliminación de las células terapéuticas transfectadas o transducidas. Las afecciones donde puede necesitarse eliminar las células incluyen, por ejemplo, GvHD, diferenciación inadecuada de las células en células más maduras del tejido o tipo celular erróneo y otras toxicidades. Para activar el interruptor de Caspasa-9 en caso de diferenciación inadecuada, es posible usar promotores específicos de tejido. Por ejemplo, en los casos donde una célula progenitora se diferencia en células óseas y adipocitos y no se desean los adipocitos, el vector usado para transfectar o transducir a la célula progenitora puede tener un promotor específico de células grasas que está ligado operativamente a la secuencia de nucleótidos de Caspasa-9. De esta manera, en caso de que las células se diferencien en células grasas, tras la administración del ligando multimérico, debe producirse la apoptosis de las células grasas inadecuadamente diferenciadas. Los métodos pueden usarse, por ejemplo, para cualquier trastorno que pueda aliviarse mediante terapia celular, incluyendo el cáncer, cáncer en la sangre o la médula ósea, otras enfermedades de la sangre o de la médula ósea, tales como anemia de células falciformes y leucodistrofia metacromática y cualquier trastorno que pueda aliviarse mediante un trasplante de células madre, por ejemplo, trastornos sanguíneos o de la médula ósea, tales como anemia de células falciformes o leucodistrofia metacromática.

Puede potenciarse la eficacia de la inmunoterapia adoptiva haciendo que los linfocitos T terapéuticos sean resistentes a las estrategias de evasión inmunitaria empleadas por las células tumorales. Los estudios *in vitro* han

demostrado que esto puede lograrse mediante transducción con un receptor dominante negativo o una citoquina inmunomoduladora (Bollard CM, et al., Blood. 2002, 99:3179-3187: Wagner HJ, et al., Cancer Gene Ther. 2004, 11:81-91). Además, la transferencia de receptores de linfocitos T específicos de antígeno permite la aplicación de la terapia con linfocitos T a una mayor variedad de tumores (Pule M, et al., Cytotherapy. 2003, 5:211-226; Schumacher TN, Nat Rev Immunol. 2002, 2:512-519). Se desarrolló y evaluó un sistema de suicidio para linfocitos T humanos para permitir su uso posterior en estudios clínicos. Se ha modificado la Caspasa-9 y se ha demostrado que se expresa de manera estable en linfocitos T humanos sin comprometer sus características funcionales y fenotípicas, mientras que muestran sensibilidad a CID, incluso en linfocitos T que tienen moléculas antiapoptóticas reguladas positivamente. (Straathof, K.C., et al., 2005, Blood 105:4248-54).

En células modificadas genéticamente usadas para terapia génica, el gen puede ser una secuencia de polinucleótidos heteróloga procedente de una fuente distinta a la de la célula que se usa para expresar el gen. El gen procede de una fuente procariota o eucariota, tal como una bacteria, un virus, levadura, un parásito, una planta e incluso un animal. El ADN heterólogo también se obtiene de más de una fuente, es decir, una construcción multigénica o una proteína de fusión. El ADN heterólogo también puede incluir una secuencia reguladora, que procede de una fuente y el gen de una fuente diferente. Por otra parte, el ADN heterólogo puede incluir secuencias reguladoras que se usan para cambiar la expresión normal de un gen endógeno celular.

Otras moléculas de caspasa

Los polipéptidos de caspasa distintos de Caspasa-9 que pueden codificarse por los polipéptidos quiméricos de la presente tecnología incluyen, por ejemplo, Caspasa-1, Caspasa-3 y Caspasa-8. Pueden encontrarse análisis de estos polipéptidos de Caspasa en, por ejemplo, MacCorkle, R.A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1998) 95:3655-3660; y Fan, L., et al. (1999) Human Gene Therapy 10:2273-2285).

Modificación de construcciones de expresión

Las construcciones de expresión codifican una región de unión a ligando multimérico y un polipéptido de Caspasa-9 o una región de unión a ligando multimérico y un polipéptido de Caspasa-9 unido a un polipéptido marcador, todos unidos operativamente. En general, la expresión "unido operativamente" pretende indicar que la secuencia promotora está ligada funcionalmente a una segunda secuencia, en donde, por ejemplo, la secuencia promotora inicia y media la transcripción del ADN correspondiente a la segunda secuencia. El polipéptido de Caspasa-9 puede ser de longitud completa o estar truncado. El polipéptido marcador puede estar ligado al polipéptido de Caspasa-9. Por ejemplo, el polipéptido marcador puede estar ligado al polipéptido de Caspasa-9 a través de una secuencia polipeptídica, tal como, por ejemplo, una secuencia de tipo 2A escindible. El polipéptido marcador puede ser, por ejemplo, CD19 o puede ser, por ejemplo, una proteína heteróloga, seleccionada para que no afecte a la actividad del polipéptido de caspasa quimérico.

El polinucleótido puede codificar el polipéptido de Caspasa-9 y una proteína heteróloga, que pueden ser, por ejemplo, un polipéptido marcador y puede ser, por ejemplo, un receptor de antígeno quimérico. El polipéptido heterólogo, por ejemplo, el receptor de antígeno quimérico, puede estar ligado al polipéptido de Caspasa-9 a través de una secuencia polipeptídica, tal como, por ejemplo, una secuencia de tipo 2A escindible.

En ciertos ejemplos, se incluye en el mismo vector un ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico, tal como, por ejemplo, un vector vírico o plasmídico, tal como un polinucleótido que codifica un segundo polipéptido. Este segundo polipéptido puede ser, por ejemplo, un polipéptido de caspasa, como se analiza en el presente documento o un polipéptido marcador. En estos ejemplos, la construcción puede diseñarse con un promotor unido operativamente a un ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica los dos polipéptidos, ligados mediante un polipéptido 2A escindible. En este ejemplo, los polipéptidos primero y segundo se separan durante la traducción, dando como resultado un polipéptido de receptor de antígeno quimérico y el segundo polipéptido. En otros ejemplos, pueden expresarse los dos polipéptidos por separado a partir del mismo vector, donde cada ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica uno de los polipéptidos está unido operativamente a un promotor separado. En otros ejemplos más, puede ligarse operativamente un promotor a los dos ácidos nucleicos, dirigiendo la producción de dos transcritos de ARN separados y por lo tanto, de dos polipéptidos. Por lo tanto, las construcciones de expresión analizadas en el presente documento pueden comprender al menos uno o al menos dos promotores.

Las secuencias de tipo 2A o las secuencias de 2A "escindibles", proceden de, por ejemplo, muchos virus diferentes, incluyendo, por ejemplo, de Thosea asigna. En ocasiones, estas secuencias también se conocen como "secuencias de salto de péptido". Cuando se coloca este tipo de secuencias en un cistrón, entre dos polipéptidos que se pretende separar, el ribosoma parece saltarse un enlace peptídico, en el caso de la secuencia de Thosea asigna, se omite el enlace entre los aminoácidos Gly y Pro. Esto deja dos polipéptidos, en este caso, el polipéptido de Caspasa-9 y el polipéptido marcador. Cuando se usa esta secuencia, el péptido que se codifica en 5' de la secuencia de 2A puede terminar con aminoácidos adicionales en el extremo carboxilo, incluyendo el residuo de Gly y cualquiera cadena arriba en la secuencia de 2A. El péptido que se codifica en 3' de la secuencia de 2A puede terminar con aminoácidos adicionales en el extremo amino, incluyendo el residuo de Pro y cualquiera cadena abajo en la secuencia de 2A. Las

secuencias de "2A" o "de tipo 2A" forman parte de una gran familia de péptidos que pueden provocar el salto de enlaces peptídicos. Se han caracterizado varias secuencias de 2A (por ejemplo, F2A, P2A, T2A) y hay ejemplos de secuencias de tipo 2A que pueden usarse en los polipéptidos de la presente solicitud.

La construcción de expresión puede insertarse en un vector, por ejemplo, un vector vírico o un plásmido. Las etapas de los métodos proporcionados pueden llevarse a cabo usando cualquier método adecuado; estos métodos incluyen, sin limitación, métodos para transducir, transformar o de otro modo proporcionar ácido nucleico a la célula presentadora de antígenos, presentada en el presente documento. El polipéptido de Caspasa-9 truncado puede estar codificado por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27 o un fragmento funcionalmente equivalente de la misma, con o sin enlazadores de ADN o tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 28 o un fragmento funcionalmente equivalente de la misma. El polipéptido de CD19 puede estar codificado por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 14 o un fragmento funcionalmente equivalente de la misma, con o sin enlazadores de ADN o tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 o un fragmento funcionalmente equivalente de la misma. Un fragmento funcionalmente equivalente del polipéptido de Caspasa-9 tiene sustancialmente la misma capacidad para inducir apoptosis que el polipéptido de SEQ ID NO: 9, con al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % de la actividad del polipéptido de SEQ ID NO: 9. Un fragmento funcionalmente equivalente del polipéptido de CD19 tiene sustancialmente la misma capacidad que el polipéptido de SEQ ID NO: 15, para actuar como marcador para su uso en la identificación y selección de células transducidas o transfectadas, con al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % del polipéptido marcador que se detecta cuando se compara con el polipéptido de SEQ ID NO: 15, usando técnicas de detección convencionales.

Más particularmente, puede usarse más de un dominio de unión a ligando o región de multimerización en la construcción de expresión. Es más, la construcción de expresión contiene una secuencia de direccionamiento a membrana. Las construcciones de expresión adecuadas pueden incluir un elemento polipeptídico coestimulador en cada lado de los elementos de unión a ligando FKBP anteriores.

En ciertos ejemplos, el polinucleótido que codifica el polipéptido de caspasa inducible se incluye en el mismo vector, tal como, por ejemplo, un vector vírico o plasmídico, en forma de un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico. En estos ejemplos, puede diseñarse la construcción con un promotor unido operativamente a un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica los dos polipéptidos, ligados mediante un polipéptido 2A escindible. En este ejemplo, los polipéptidos primero y segundo se escinden después de la expresión, dando como resultado un polipéptido de receptor de antígeno quimérico y un polipéptido de Caspasa-9 inducible. En otros ejemplos, pueden expresarse los dos polipéptidos por separado a partir del mismo vector, donde cada ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica uno de los polipéptidos está unido operativamente a un promotor separado. En otros ejemplos más, puede ligarse operativamente un promotor a los dos ácidos nucleicos, dirigiendo la producción de dos transcritos de ARN separados y por lo tanto, de dos polipéptidos. Por lo tanto, las construcciones de expresión analizadas en el presente documento pueden comprender al menos uno o al menos dos promotores.

En otros ejemplos más, los polipéptidos pueden expresarse en una célula usando dos vectores separados. Las células pueden cotransfectarse o cotransformarse con los vectores o pueden introducirse los vectores en las células en momentos diferentes.

Regiones de unión a ligando

El dominio de unión a ligando ("dimerización") o la región de multimerización, de la construcción de expresión puede ser cualquier dominio conveniente que permita la inducción usando un ligando natural o no natural, por ejemplo, un ligando sintético no natural. La región de multimerización puede ser interna o externa respecto de la membrana celular, dependiendo de la naturaleza de la construcción y de la elección del ligando. Se conoce una gran variedad de proteínas de unión a ligando, incluyendo receptores, que incluyen proteínas de unión a ligando con las regiones citoplasmáticas indicadas anteriormente. Como se usa en el presente documento, la expresión "dominio de unión a ligando" puede ser intercambiable con el término "receptor". Son particularmente interesantes las proteínas de unión a ligando para las que se conocen o pueden producirse fácilmente ligandos (por ejemplo, ligandos orgánicos pequeños). Estos dominios de unión a ligando o receptores incluyen los FKBP y los receptores de ciclofilina, los receptores de esteroides, el receptor de tetraciclina, los otros receptores indicados anteriormente y similares, así como receptores "no naturales", que pueden obtenerse a partir de anticuerpos, en particular, la subunidad de cadena pesada o ligera, secuencias mutadas de los mismos, secuencias de aminoácidos aleatorias obtenidas mediante procedimientos estocásticos, síntesis combinatorias y similares. La región de unión a ligando puede seleccionarse entre el grupo que consiste en la región de unión a ligando FKBP, región de unión al ligando de receptor de ciclofilina, región de unión al ligando de receptor de esteroides, región de unión al ligando de receptores de ciclofilina y región de unión al ligando de receptor de tetraciclina. A menudo, la región de unión a ligando comprende una secuencia $F_{v'}F_{vls}$. Algunas veces, la secuencia $F_{v'}F_{vls}$ comprende además una secuencia $F_{v'}$ adicional. Los ejemplos incluyen, por ejemplo, los analizados en Kopytek, S.J., et al., Chemistry & Biology 7:313-321 (2000) y en Gestwicki, J.E., et al., Combinatorial Chem. & High Throughput Screening 10:667-675 (2007); Clackson T (2006) Chem Biol Drug Des 67:440-2; Clackson, T., en Chemical Biology: From Small Molecules to Systems Biology and Drug Design

(Schreiber, s, et al., eds., Wiley, 2007)).

En su mayoría, los dominios de unión a ligando o los dominios de unión a receptor serán de al menos aproximadamente 50 aminoácidos y de menos de aproximadamente 350 aminoácidos, normalmente menos de 200 aminoácidos, en forma del dominio natural o de la porción activa truncada del mismo. El dominio de unión puede, por ejemplo, ser pequeño (<25 kDa, para permitir una transfección eficaz en vectores víricos), monomérico, no inmunogénico, y tener ligandos sintéticamente accesibles permeables a células no tóxicos que pueden configurarse para la dimerización.

El dominio de receptor puede ser intracelular o extracelular dependiendo del diseño de la construcción de expresión y la disponibilidad de un ligando adecuado. Para ligandos hidrófobos, el dominio puede encontrarse a cualquiera de los dos lados de la membrana, pero para ligandos hidrófilos, particularmente ligandos de proteína, el dominio de unión normalmente será externo respecto de la membrana celular, a menos que haya un sistema de transporte para internalizar el ligando en una forma en la que se encuentre disponible para la unión. Para un receptor intracelular, la construcción puede codificar un péptido de señal y un dominio transmembrana 5' o 3' de la secuencia de dominio de receptor o puede tener una secuencia de señal de acoplamiento a lípidos en 5' de la secuencia de dominio de receptor. En los casos donde el dominio de receptor se encuentra entre el péptido de señal y el dominio transmembrana, el dominio de receptor será extracelular.

La porción de la construcción de expresión que codifica el receptor puede someterse a mutagénesis por diversos motivos. La proteína mutagenizada puede proporcionar una mayor afinidad de unión, permitir discernir entre el ligando del receptor de origen natural y el receptor mutagenizado, proporcionar oportunidades para diseñar un par de receptor-ligando o similares. El cambio en el receptor puede implicar cambios en los aminoácidos que se sabe que están en el sitio de unión, mutagénesis aleatoria usando técnicas combinatorias, cuando los codones para los aminoácidos asociados con el sitio de unión u otros aminoácidos asociados con cambios conformacionales pueden estar sujetos a mutagénesis cambiando los codones para el aminoácido particular, ya sea con cambios conocidos o aleatoriamente, expresando las proteínas resultantes en un hospedador procariota adecuado y después, explorando la unión de las proteínas resultantes.

Los anticuerpos y subunidades de anticuerpos, por ejemplo, la cadena pesada o ligera, en particular, fragmentos, más en particular, la totalidad o parte de la región variable o fusiones de cadena pesada y ligera para crear unión de alta afinidad, pueden usarse como dominio de unión. Los anticuerpos que se contemplan incluyen aquellos que son un producto ectópico expresado ectópicamente, tal como un dominio extracelular que no provocaría una respuesta inmunitaria y que generalmente no se expresa en la periferia (es decir, fuera del área del SNC/cerebro). Dichos ejemplos, incluyen, pero sin limitación, receptor de factor de crecimiento nervioso de baja afinidad (LNGFR) y proteínas de la superficie embrionaria (es decir, antígeno carcinoembrionario).
Es más, pueden prepararse anticuerpos contra moléculas hapténicas, que son fisiológicamente aceptables y explorarse la afinidad de unión de las subunidades de anticuerpo exploradas. El ADNc que codifica las subunidades puede aislarse y modificarse mediante la eliminación de la región constante, porciones de la región variable, mutagénesis de la región variable o similares, para obtener un dominio de proteína de unión que tiene la afinidad adecuada por el ligando. De esta manera, puede emplearse prácticamente cualquier compuesto hapténico fisiológicamente aceptable como ligando o para proporcionar un epítopo para el ligando. En lugar de unidades de anticuerpo, pueden emplearse receptores naturales, donde se conoce el dominio de unión y hay un ligando de unión útil.

Oligomerización

La señal transducida normalmente será el resultado de la oligomerización mediada por ligando de las moléculas de proteína quimérica, es decir, como resultado de la oligomerización después de la unión al ligando, aunque pueden emplearse otros eventos de unión, por ejemplo, activación alostérica, para iniciar una señal. La construcción de la proteína quimérica variará en lo referente al orden de los diversos dominios y el número de repeticiones de un dominio individual.

Para multimerizar el receptor, el ligando para los dominios de unión a ligando/dominios de receptor de las proteínas superficiales de membrana quiméricas será normalmente multimérico en el sentido de que tendrá al menos dos sitios de unión, siendo capaz cada uno de los sitios de unión de unirse al dominio de receptor de ligando. Por "región de unión a ligando multimérico" se entiende una región de unión a ligando que se une a un ligando multimérico. La expresión "ligandos multiméricos" incluye ligandos diméricos. Un ligando dimérico tendrá dos sitios de unión capaces de unirse al dominio de receptor a ligando. De manera deseable, los presentes ligandos serán un dímero o un oligómero de mayor orden, normalmente no mayor de aproximadamente tetramérico, de moléculas orgánicas sintéticas pequeñas, siendo las moléculas individuales de al menos aproximadamente 150 Da y menos de aproximadamente 5 kDa, normalmente menos de aproximadamente 3 kDa. Puede emplearse una variedad de pares de ligandos sintéticos y receptores. Por ejemplo, en aspectos que implican receptores naturales, puede usarse FK506 dimérico con un receptor FKBP12, puede usarse ciclosporina A dimerizada con el receptor de ciclofilina, estrógeno dimerizado con un receptor de estrógenos, glucocorticoides dimerizados con un receptor de glucocorticoides, tetraciclina dimerizada con el receptor de tetraciclina, vitamina D dimerizada con el receptor de

vitamina D y similares. Como alternativa, pueden usarse mayores órdenes de los ligandos, por ejemplo, triméricos. Para aspectos que implican receptores no naturales, por ejemplo, subunidades de anticuerpo, subunidades de anticuerpo modificadas, anticuerpos de una sola cadena formados por regiones variables de cadena pesada y ligera en tándem, separados por un dominio enlazador flexible o receptores modificados y secuencias mutadas de los mismos y similares, puede usarse cualquiera de una gran variedad de compuestos. Una característica significativa de estas unidades de ligando es que cada sitio de unión es capaz de unirse al receptor con alta afinidad y son capaces de dimerizarse químicamente. Asimismo, hay métodos disponibles para equilibrar la hidrofobia/hidrofilia de los ligandos, de tal forma que son capaces de disolverse en suero a niveles funcionales, y aun así difundirse por las membranas plasmáticas para la mayoría de aplicaciones. Los presentes métodos pueden utilizar la técnica de dimerización inducida químicamente (CID) para producir una proteína o polipéptido condicionalmente controlado. Esta técnica, además de ser inducible, es también reversible, debido a la degradación del agente de dimerización lábil o a la administración de un inhibidor competitivo monomérico.

El sistema CID usa ligandos bivalentes sintéticos para reticular rápidamente moléculas de señalización que se fusionan a dominios de unión a ligando. El sistema se ha usado para desencadenar la oligomerización y activación de la superficie celular (Spencer, D. M., et al., Science, 1993. 262: p. 1019-1024; Spencer D. M. et al., Curr Biol 1996, 6:839-847; Blau, C. A. et al., Proc Natl Acad.Sci. USA 1997, 94:3076-3081) o proteínas citosólicas (Luo, Z. et al., Nature 1996,383:181-185; MacCorkle, R. A. et al., Proc Natl Acad Sci USA 1998, 95:3655-3660), el reclutamiento de factores de transcripción a elementos de ADN para modular la transcripción (Ho, S. N. et al., Nature 1996, 382:822-826; Rivera, V. M. et al., Nat. Med. 1996, 2:1028-1032) o el reclutamiento de moléculas de señalización a la membrana plasmática para estimular la señalización (Spencer D. M. et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 1995, 92:9805-9809; Holsinger, L. J. et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 1995, 95:9810-9814).

El sistema CID está basado en la noción de que la agregación de receptores de superficie activa eficazmente las casadas de señalización aguas abajo. En el caso más sencillo, el sistema CID usa un análogo dimérico del fármaco inmunosupresor permeable a lípidos, FK506, que pierde su bioactividad normal a la vez que obtiene la capacidad para reticular moléculas fusionadas generalmente a la proteína de unión a FK506, FKBP12. Al fusionar uno o más FKBP a Caspasa-9, se puede estimular la actividad de Caspasa-9 de una manera dependiente de dimerizador pero independiente de ligando y ectodominio. Esto dota al sistema de control temporal, reversibilidad usando análogos de fármacos monoméricos y especificidad potenciada. La alta afinidad de los CID de tercera generación AP20187/AP1903 por su dominio de unión, FKBP12, permite la activación específica del receptor recombinante *in vivo* sin la inducción de efectos secundarios no específicos mediante FKBP12 endógeno. Las variantes de FKBP12 que tienen sustituciones y eliminaciones de aminoácidos, tales como FKBP12v36, que se unen a un fármaco dimerizador, también se pueden utilizar. Las variantes de FKBP12 incluyen, pero sin limitación, aquellas que tienen sustituciones de aminoácidos en la posición 36, seleccionados entre el grupo que consiste en valina, leucina, isoleucina y alanina. Además, los ligandos sintéticos son resistentes a la degradación por proteasas, haciendo que sean más eficientes para activar receptores *in vivo* que la mayoría de agentes proteicos administrados.

Los ligandos usados son capaces de unirse a dos o más de los dominios de unión a ligando. Las proteínas quiméricas pueden ser capaces de unirse a más de un ligando cuando contienen más de un dominio de unión a ligando. El ligando es normalmente un agente no proteínico o un químico. Los ligandos ejemplares incluyen, pero sin limitación, FK506 (por ejemplo, FK1012).

Otras regiones de unión a ligando pueden ser, por ejemplo, regiones diméricas o regiones de unión a ligando modificado con una sustitución inestable, tales como, por ejemplo, FKBP12(V36): La proteína de unión a FK506 humano de 12 kDa con una sustitución de F36 a V, la secuencia codificante madura completa (aminoácidos 1-107), proporciona un sitio de unión para el fármaco dimerizador sintético AP1903 (Jemal, A. et al., CA Cancer J. Clinic. 58, 71-96 (2008); Scher, H.I. y Kelly, W.K., Journal of Clinical Oncology 11, 1566-72 (1993)). También pueden usarse dos copias en tándem de la proteína en la construcción, de tal forma que se inducen oligómeros de mayor orden tras la reticulación con AP1903.

F36V'-FKBP: F36V'-FKBP es una versión de codones inestables de F36V-FKBP. Codifica una secuencia de polipéptido idéntica a F36V-FKPB, pero tiene una homología de tan solo el 62 % a nivel de nucleótido.
Se diseñó F36V'-FKBP para reducir la recombinación en vectores retrovíricos (Schellhammer,P.F. et al., J. Urol. 157, 1731-5 (1997)). F36V'-FKBP se construyó mediante un procedimiento de ensamblaje por la PCR. El transgén contiene una copia de F36V'-FKBP unida directamente a una copia de F36V-FKBP.

El ligando puede ser una molécula pequeña. Puede seleccionarse el ligando adecuado para la región de unión a ligando seleccionada. A menudo, el ligando es dimérico, a veces, el ligando es un FK506 dimérico o un análogo similar a FK506 dimérico. El ligando puede ser AP1903 (nombre del índice CAS: ácido 2-piperidincarboxílico, 1-[(2S)-1-oxo-2-(3,4,5-trimetoxifenil)butil]-, 1,2-etanodiilbis[imino(2-oxo-2,1-etanodiil)oxi-3,1-fenilen[(1R)-3-(3,4-dimetoxifenil)propiliden]]éster, [2S-[1(R*),2R*[S*[S*[1(R*),2R*]]]]]-(9Cl), N.º de registro CAS; 195514-63-7; Fórmula molecular: C78H98N4O20 Peso molecular: 1411,65). El ligando puede ser AP20187. El ligando puede ser un análogo de AP20187, tal como, por ejemplo, AP1510. Ciertos análogos pueden ser adecuado para el FKBP12 y ciertos análogos adecuados para la versión inestable de FKBP12. Puede incluirse una región de unión a ligando en la proteína quimérica. Asimismo, pueden incluirse dos o más regiones de unión a ligando. Cuando, por ejemplo, la

región de unión a ligando es FKBP12, cuando se incluyen dos de estas regiones, una puede ser, por ejemplo, la versión inestable.

Otros sistemas de dimerización contemplados incluyen el sistema de cumamicina/ADN girasa B. La dimerización inducida por cumamicina activa una proteína Raf modificada y estimula la cascada de MAP quinasa. Véase Farrar, M. A., et al., (1996) Nature 383, 178-181. El sistema de ácido abscísico (ABA) desarrollado por GR Crabtree y colaboradores (Liang FS, et al., Sci Signal. 15 de marzo de 2011;4(164):rs2), puede usarse, pero al igual que la ADN girasa B, se basa en una proteína extraña, que podría ser inmunogénica.

Direccionamiento a la membrana

Una secuencia o región de direccionamiento a la membrana posibilita el transporte de la proteína quimérica a la superficie de la membrana celular, donde las mismas secuencias u otras distintas pueden codificar la unión de la proteína quimérica a la superficie de la membrana celular. Las moléculas en asociación con las membranas celulares contienen ciertas regiones que facilitan la asociación de la membrana y dichas regiones pueden incorporarse en una molécula de proteína quimérica para generar moléculas dirigidas a la membrana. Por ejemplo, algunas proteínas contienen secuencias en el extremo N-terminal o C-terminal que están aciladas y estos motivos de acilo facilitan la asociación a la membrana. Dichas secuencias son reconocidas por las aciltransferasas y a menudo toman la forma de un motivo de secuencia particular. Ciertos motivos de acilación pueden modificarse con un solo motivo de acilo (normalmente seguido de varios motivos cargados positivamente (por ejemplo, c-Src humano: M-G-S-N-K-S-K-P-K-D-A-S-Q-R-R-R) para mejorar la asociación con grupos de cabeza de lípido aniónico) y otros pueden modificarse con múltiples motivos de acilo. Por ejemplo, la secuencia N-terminal de la proteína tirosina quinasa Src puede comprender un solo motivo de miristoílo. Las regiones de acilación duales están ubicadas en las regiones N-terminales de ciertas proteínas quinasas, tal como un subconjunto de miembros de la familia Src (por ejemplo, Yes, Fyn, Lck) y subunidades alfa de proteína G. Dichas regiones de acilación dual están ubicadas en los dieciocho primeros aminoácidos de dichas proteínas y conforman el motivo de secuencia Met-Gly-Cys-Xaa-Cys, donde la Met está escindida, la Gly está N-acilada y uno de los residuos de Cys está S-acilado. La Gly normalmente está miristoilada y una Cys puede estar palmitoilada. Las regiones de acilación que conforman el motivo de secuencia Cys-Ala-Ala-Xaa (las denominadas "cajas de CAAX"), que pueden modificarse con motivos de isoprenilo C15 o C10, forman el extremo C-terminal de las subunidades gamma de proteína G y otras proteínas (por ejemplo, www.ebi.ac.uk/inter-pro/DisplaylproEntry?ac=IPR001230) también pueden utilizarse. Estos y otros motivos de acilación incluyen, por ejemplo, los analizados en Gauthier-Campbell et al., Molecular Biology of the Cell 15: 2205-2217 (2004); Glabati et al., Biochem. J. 303: 697-700 (1994) y Zlakine et al., J. Cell Science 110: 673-679 (1997) y pueden incorporarse en las moléculas quiméricas para inducir localización en la membrana. Puede incorporarse una secuencia nativa de una proteína que contiene un motivo de acilación en una proteína quimérica. Por ejemplo, una porción N-terminal de Lck, Fyn o Yes o una subunidad alfa de proteína G, tal como los veinticinco primeros aminoácidos N-terminales o menos de dichas proteínas (por ejemplo, de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 aminoácidos, de aproximadamente 10 a aproximadamente 19 aminoácidos o de aproximadamente 15 a aproximadamente 19 aminoácidos de la secuencia nativa con mutaciones opcionales), pueden incorporarse en el extremo N-terminal de una proteína quimérica. Una secuencia C-terminal de aproximadamente 25 aminoácidos o menos de una subunidad gamma de proteína G que contiene una secuencia de motivo de caja de CAAX (por ejemplo, de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 aminoácidos, de aproximadamente 10 a aproximadamente 18 aminoácidos o de aproximadamente 15 a aproximadamente 18 aminoácidos de la secuencia nativa con mutaciones opcionales) puede unirse al extremo C-terminal de una proteína quimérica.

Un motivo de acilo puede tener un valor de log p de +1 a +6 y en ocasiones, puede tener un valor de log p de +3 a +4,5. Los valores de log p son una medida de la hidrofobia y en ocasiones proceden de estudios de partición en octanol/agua, en los que las moléculas con mayor hidrofobia se particionan en octanol con mayor frecuencia y se caracterizan con un mayor valor de log p. Se han publicado valores de log p para una serie de moléculas lipófilas y pueden calcularse valores de log p usando procesos de partición conocidos (por ejemplo, Chemical Reviews, Vol. 71, tema 6, página 599, donde la entrada 4493 muestra que el ácido láurico tiene un valor de log p de 4,2). Puede ligarse un motivo de acilo a una composición peptídica analizada anteriormente y evaluarse su actividad antimicrobiana usando métodos conocidos y los analizados posteriormente en el presente documento. El motivo de acilo es en ocasiones un alquilo C1-C20, alquenilo C2-C20, alquinilo C2-C20, cicloalquilo C3-C6, haloalquilo C1-C4, cicloalquilalquilo C4-C12, arilo, arilo sustituido o aril (C1-C4) alquilo, por ejemplo. Cualquier motivo que contiene acilo en ocasiones es un ácido graso y son ejemplos de motivos de ácido graso los motivos propilo (C3), butilo (C4), pentilo (C5), hexilo (C6), heptilo (C7), octilo (C8), nonilo (C9), decilo (C10), undecilo (C11), laurilo (C12), miristilo (C14), palmitilo (C16), estearilo (C18), araquidilo (C20), behenilo (C22) y lignocerilo (C24) y cada motivo puede contener 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 insaturaciones (es decir, dobles enlaces). En ocasiones, un motivo de acilo es una molécula de lípido, tal como un lípido de fosfatidilo (por ejemplo, fosfatidilserina, fosfatidil inositol, fosfatidil etanolamina, fosfatidil colina), esfingolípido (por ejemplo, esfingomielina, esfingosina, ceramida, gangliósido, cerebrósido) o versiones modificadas de los mismos. Uno, dos, tres, cuatro o cinco o más motivos de acilo pueden unirse a una región de asociación a membrana.

En el presente documento, una proteína quimérica también puede incluir una secuencia transmembrana de un solo pase o de múltiples pases (por ejemplo, en el extremo N-terminal o C-terminal de la proteína quimérica). Se

encuentran regiones transmembrana de un solo pase en ciertas moléculas de CD, tirosina quinasas receptoras, serina/treonina quinasa receptoras, TGFbeta, BMP, activina y fosfatasas. Las regiones transmembrana de un solo pase normalmente incluyen una región de péptido de señal de aproximadamente 20 a aproximadamente 25 aminoácidos, muchos de los cuales son aminoácidos hidrófobos y pueden formar una hélice alfa. El tramo transmembrana a menudo va seguido de un tramo corto de aminoácidos cargados positivamente para anclar la proteína a la membrana. Las proteínas de múltiples pases incluyen bombas de iones, canales iónicos y transportadores e incluyen dos o más hélices que atraviesan varias veces la membrana. En ocasiones, se incorpora en una proteína quimérica toda o sustancialmente toda la proteína de múltiples pases. Las secuencias para regiones transmembrana de un solo pase y de múltiples pases son conocidas y pueden seleccionarse para su incorporación en una molécula de proteína quimérica.

Puede emplearse cualquier secuencia de direccionamiento a la membrana que sea funcional en el hospedador y puede estar o no asociada con uno de los otros dominios de la proteína quimérica. Dichas secuencias pueden incluir, pero sin limitación, secuencia de direccionamiento a miristoilación, secuencia de direccionamiento a palmitoilación, secuencias de prenilación (es decir, farnesilación, geranil-geranilación, caja de CAAX), motivos de interacción proteína-proteína o secuencias transmembrana (que utilizan péptidos de señal) de receptores. Los ejemplos incluyen aquellos analizados en, por ejemplo, ten Klooster JP et al, Biology of the Cell (2007) 99, 1-12, Vincent, S., et al., Nature Biotechnology 21:936-40, 1098 (2003).

Existen dominios de proteína adicionales que pueden aumentar la retención de proteínas en diversas membranas. Por ejemplo, un dominio de homología de plecstrina (PH) de ~ 120 aminoácidos se encuentra en más de 200 proteínas humanas que normalmente están implicadas en la señalización intracelular. Los dominios PH pueden unirse a varios lípidos de fosfatidilinositol (PI) en las membranas (por ejemplo, PI (3, 4,5)-P3, PI (3,4)-P2, PI (4,5)-P2) y por lo tanto, desempeñan un papel clave en el reclutamiento de proteínas a diferentes compartimentos de la membrana o celulares. El estado de fosforilación de los lípidos de PI normalmente está regulado, tal como por PI-3 quinasa o PTEN y por tanto, la interacción de las membranas con dominios PH no es tan estable como con lípidos de acilo.

AP1903 para inyección

El API AP1903 se fabrica por Alphora Research Inc. y el producto farmacológico de AP1903 para inyección se fabrica por Formatech Inc. Se formula como una solución a 5 mg/ml de AP1903 en una solución al 25 % del solubilizante no iónico HS 15 (250 mg/ml, BASF). A temperatura ambiente, esta formulación es una solución transparente ligeramente amarillenta. Tras la refrigeración, esta formulación sufre una transición de fase reversible, dando como resultado una solución lechosa. Esta transición de fase se revierte tras volver a calentar hasta temperatura ambiente. El relleno es de 2,33 ml en un vial de vidrio de 3 ml (-10 mg de AP1903 para inyección en total por vial).

Se retira AP1903 del refrigerador la noche anterior a la dosificación al paciente y se almacena a una temperatura de aproximadamente 21 °C durante una noche, de tal forma que la solución es transparente antes de su dilución. La solución se repara a los 30 minutos de iniciarse la infusión en botellas de vidrio o polietileno o bolsas no de DEHP y se almacenan a aproximadamente 21 °C antes de la dosificación.

Toda la medicación del estudio se mantiene a una temperatura entre 2 °C y 8 °C, protegida de luz y calor excesivos y se almacena en un área cerrada con llave de acceso restringido.

Tras determinarse la necesidad de administrar AP1903 e inducir el polipéptido de Caspasa-9 inducible, puede administrarse a los pacientes, por ejemplo, una sola dosis física de AP1903 para inyección (0,4 mg/kg) mediante infusión IV a lo largo de 2 horas, usando un kit para infusión esterilizado que no sea de DEHP ni de óxido de etileno. La dosis de AP1903 se calcula individualmente para todos los pacientes y no hace falta volver a calcularla a menos que fluctúe el peso corporal en ≥10 %. La dosis calculada se diluye en 100 ml de suero salino normal al 0,9 % antes de la infusión.

En un estudio de fase 1 previo de AP1903, se trató a 24 voluntarios sanos con dosis individuales de AP1903 para inyección a niveles de dosis de 0,01, 0,05, 0,1, 0,5 y 1,0 mg/kg infundido por vía IV a lo largo de 2 horas. Los niveles plasmáticos de AP1903 fueron directamente proporcionales a la dosis, con valores medios de $C_{máx}$ en el intervalo de aproximadamente 10 - 1275 ng/ml a lo largo del intervalo de dosis de 0,01 - 1,0 mg/kg. Después del periodo de infusión inicial, las concentraciones sanguíneas demostraron una rápida fase de distribución, reduciéndose los niveles plasmáticos a aproximadamente un 18, 7 y 1 % de la concentración máxima a las 0,5, 2 y 10 horas después de la dosis, respectivamente. Se demostró que AP1903 para inyección es seguro y bien tolerado a todos los niveles de dosis y demostró un perfil farmacocinético favorable. Iuliucci JD, et al., J Clin Pharmacol. 41: 870-9, 2001.

La dosis fija de AP1903 para inyección usada, por ejemplo, puede ser de 0,4 mg/kg por vía intravenosa infundida a lo largo de 2 horas. La cantidad de AP1903 necesaria *in vitro* para la eficaz señalización de las células es de 10 - 100 nM (PM de 1600 Da). Esto es equivalente a 16 - 160 µg/l o -0,016 - 1,6 mg/kg (1,6 -160 mg/kg). Las dosis de hasta 1 mg/kg se toleraron bien en el estudio de fase 1 de AP1903 analizado anteriormente. Por lo tanto, 0,4 mg/kg

puede ser una dosis segura y eficaz de AP1903 para este estudio de fase I en combinación con las células terapéuticas.

Marcadores de selección

Las construcciones de expresión pueden contener construcciones de ácido nucleico cuya expresión se identifica *in vitro* o *in vivo* incluyendo un marcador en la construcción de expresión. Dichos marcadores podrían conferir un cambio identificable a la célula, permitiendo una fácil identificación de células que contienen la construcción de expresión. Normalmente, la inclusión de un fármaco marcador de selección ayuda en la clonación y en la selección de transformantes. Por ejemplo, los genes que confieren resistencia a la neomicina, puromicina, higromicina, DHFR, GPT, zeocina e histidinol son marcadores de selección útiles. Como alternativa, se emplean enzimas, tales como la timidina quinasa (tk) del virus del herpes simple I. También pueden emplearse marcadores de superficie inmunológicos que contienen los dominios no de señalización extracelulares de varias proteínas (por ejemplo, CD34, CD19, LNGFR), permitiendo un método directo para la clasificación mediada por anticuerpos magnética o de fluorescencia. No se cree que el marcador de selección empleado sea importante, en tanto que pueda expresarse simultáneamente con el ácido nucleico que codifica un producto génico. Los ejemplos adicionales de marcadores de selección incluyen, por ejemplo, indicadores, tales como GFP, EGFP, beta-gal o cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). La proteína marcadora, tal como, por ejemplo, CD19 puede usarse para la selección de las células para transfusión, tal como, por ejemplo, en la selección inmunomagnética. Como se analiza en el presente documento, un marcador de CD19 se distingue de un anticuerpo anti-CD19 o, por ejemplo, un scFv, TCR u otro motivo de reconocimiento de antígeno que se une a CD19.
Puede incluirse un polipéptido en el vector de expresión para ayudar a clasificar las células. Por ejemplo, puede incorporarse el epítopo mínimo de CD34 en el vector. Los vectores de expresión usados para expresar los receptores de antígeno quimérico o las moléculas estimulantes quiméricas proporcionados en el presente documento pueden comprender además un polinucleótido que codifica el epítopo mínimo de CD34 de 16 aminoácidos. Puede incorporarse el epítopo mínimo de CD34 en la posición amino-terminal del tallo de CD8.

Regiones transmembrana

En el presente documento, un receptor de antígeno quimérico también puede incluir una secuencia transmembrana de un solo pase o de múltiples pases (por ejemplo, en el extremo N-terminal o C-terminal de la proteína quimérica). Se encuentran regiones transmembrana de un solo pase en ciertas moléculas de CD, receptores de tirosina quinasa, receptores de serina/treonina quinasa, TGFβ, BMP, activina y fosfatasas. Las regiones transmembrana de un solo pase normalmente incluyen una región de péptido de señal de aproximadamente 20 a aproximadamente 25 aminoácidos, muchos de los cuales son aminoácidos hidrófobos y pueden formar una hélice alfa. El tramo transmembrana a menudo va seguido de un tramo corto de aminoácidos cargados positivamente para anclar la proteína a la membrana. Las proteínas de múltiples pases incluyen bombas de iones, canales iónicos y transportadores e incluyen dos o más hélices que atraviesan varias veces la membrana. En ocasiones, se incorpora en una proteína quimérica toda o sustancialmente toda la proteína de múltiples pases. Las secuencias para regiones transmembrana de un solo pase y de múltiples pases son conocidas y pueden seleccionarse para su incorporación en una molécula de proteína quimérica.

El dominio transmembrana puede fusionarse al dominio extracelular del CAR. Se usa el dominio transmembrana que puede asociarse naturalmente con uno de los dominios en el CAR. Asimismo, puede usarse un dominio transmembrana que no está asociado naturalmente con uno de los dominios en el CAR. En algunos casos, puede seleccionarse o modificarse el dominio transmembrana mediante sustitución de aminoácidos (por ejemplo, normalmente cargado a un motivo hidrófobo) para evitar la unión de dichos dominios a los dominios transmembrana de las mismas o diferentes proteínas de superficie de la membrana para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo de receptor.

Los dominios transmembrana pueden, por ejemplo, proceder de la cadena alfa, beta o zeta del receptor de linfocitos T, CD3-ε, CD3 ζ, CD4, CD5, CD8, CD8α, CD9, CD16, CD22, CD28, CD33, CD38, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 o CD154. Sin embargo, en algunos ejemplos, el dominio transmembrana puede sintetizarse *de novo*, comprendiendo principalmente motivos hidrófobos, tales como, por ejemplo, leucina y valina. Un enlazador polipeptídico corto puede formar el enlace entre el dominio transmembrana y el dominio intracelular del receptor de antígeno quimérico. Los receptores de antígeno quimérico pueden comprender un tallo, es decir, una región extracelular de aminoácidos entre el dominio extracelular y el dominio transmembrana. Por ejemplo, el tallo puede ser una secuencia de aminoácidos naturalmente asociada con el dominio transmembrana seleccionado. El receptor de antígeno quimérico puede comprender un dominio transmembrana de CD8, el receptor de antígeno quimérico puede comprender un dominio transmembrana de CD8 y aminoácidos adicionales en la porción extracelular del dominio transmembrana, el receptor de antígeno quimérico puede comprender un dominio transmembrana de CD8 y un tallo de CD8. El receptor de antígeno quimérico puede comprender además una región de aminoácidos entre el dominio transmembrana y el dominio citoplasmático, que se asocian naturalmente con el polipéptido del que procede el dominio transmembrana.

Regiones de control

Promotores

No se cree que sea importante el promotor particular empleado para controlar la expresión de una secuencia de polinucleótido de interés, en tanto que sea capaz de dirigir la expresión del polinucleótido en la célula diana. Por lo tanto, en los casos donde se usa como diana una célula humana, la región codificante de la secuencia de polinucleótido puede, por ejemplo, colocarse adyacente a y bajo el control de un promotor que pueda expresarse en una célula humana. Hablando en general, dicho promotor podría incluir un promotor humano o vírico.

Puede usarse el promotor del gen inmediato temprano de citomegalovirus humano (CMV), el promotor temprano de SV40, la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous, β-actina, el promotor de insulina de rata y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa para obtener expresión de alto nivel de la secuencia codificante de interés. También se contempla el uso de otros promotores víricos, de células de mamíferos o de bacteriófagos que son bien conocidos en la técnica para lograr la expresión de una secuencia codificante de interés, a condición de que los niveles de expresión sean suficientes para un fin determinado. Al emplear un promotor con propiedades bien conocidas, puede optimizarse el nivel y el patrón de expresión de la proteína de interés después de la transfección o transformación.

La selección de un promotor que está regulado en respuesta a señales fisiológicas o sintéticas específicas puede permitir la expresión inducible del producto génico. Por ejemplo, en caso de que la expresión de un transgén o de transgenes cuando se usa un vector multicistrónico, sea tóxica para las células en las que se produce el vector, es deseable impedir o reducir la expresión de uno o más de los transgenes. Los ejemplos de transgenes que son tóxicos para la línea celular productora son genes proapoptóticos y de citoquinas. Hay disponibles varios sistemas de promotor inducible para la producción de vectores víricos, donde los productos transgénicos son tóxicos (añadir más promotores inducibles).

El sistema de ecdisona (Invitrogen, Carlsbad, CA) es un sistema de este tipo. Este sistema está diseñado para permitir la expresión regulada de un gen de interés en células de mamífero. Consiste en un mecanismo de expresión estrechamente regulado que permite un nivel de expresión basal prácticamente nulo del transgén, pero una inducibilidad de más de 200 veces. El sistema está basado en el receptor heterodimérico de ecdisona de Drosophila y cuando la ecdisona o un análogo, tal como la muristerona A se une al receptor, el receptor activa un promotor para activar la expresión del transgén aguas abajo, lográndose altos niveles de transcritos de ARNm. En este sistema, ambos monómeros del receptor heterodimérico se expresan constitutivamente a partir de un vector, mientras que el promotor sensible a la ecdisona, que dirige la expresión del gen de interés, se encuentra en otro plásmido. Por lo tanto, podría ser útil la introducción de este tipo de sistema en el vector de transferencia génica de interés. La cotransfección de plásmidos que contienen el gen de interés y los monómeros de receptor en la línea celular productora podría permitir la producción del vector de transferencia génica sin la expresión de un transgén potencialmente tóxico. En el momento adecuado, puede activarse la expresión del transgén con ecdisona o muristerona A.

Otro sistema inducible que puede ser útil es el sistema Tet-Off™ o Tet-On™ (Clontech, Palo Alto, CA) desarrollado originariamente por Gossen y Bujard (Gossen y Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551, 1992; Gossen et al., Science, 268:1766-1769, 1995). Este sistema permite regular altos niveles de expresión génica en respuesta a tetraciclina o derivados de tetraciclina, tales como doxiciclina. En el sistema Tet-On™, la expresión génica se activa en presencia de doxiciclina, mientras que en el sistema Tet-Off™, la expresión génica se activa en ausencia de doxiciclina. Estos sistemas están basados en dos elementos reguladores procedentes del operón de resistencia a la tetraciclina de *E. coli*, la secuencia de operador de tetraciclina a la que se une el represor de tetraciclina y la proteína represora de tetraciclina. El gen de interés se clona en un plásmido por detrás de un promotor que tiene elementos sensibles a tetraciclina presentes en el mismo. Un segundo plásmido contiene un elemento regulador denominado el transactivador controlado por tetraciclina, que está compuesto, en el sistema Tet-Off™, por el dominio VP16 del virus del herpes simple y por el represor de tetraciclina de tipo silvestre. Por tanto, en ausencia de doxiciclina, la transcripción está activada de manera constitutiva. En el sistema Tet-On™, el represor de tetraciclina no es de tipo silvestre y la presencia de doxiciclina activa la transcripción. Para la producción de vector para terapia génica, puede usarse el sistema Tet-Off™, de tal forma que las células productoras pueden cultivarse en presencia de tetraciclina o doxiciclina y se previene la expresión de un transgén potencialmente tóxico, pero cuando el vector se introduce en el paciente, la expresión génica puede estar activada de manera constitutiva.

En algunas circunstancias, es deseable regular la expresión de un transgén en un vector de terapia génica. Por ejemplo, se utilizan diferentes promotores víricos con diferentes fuerzas de actividad dependiendo del nivel de expresión deseado. En células de mamífero, normalmente se usa el promotor temprano inmediato de CMV para proporcionar una fuerte activación transcripcional. El promotor de CMV se revisa en Donnelly, J.J., et al., 1997. Annu. Rev. Immunol. 15:617-48. También se han usado versiones modificadas del promotor de CMV que son menos potentes cuando se desean niveles reducidos de expresión del transgén. Cuando se desea la expresión de un transgén en células hematopoyéticas, normalmente se usan promotores retrovíricos, tales como los TLR de MLV o MMTV. Otros promotores víricos que se usan dependiendo del efecto deseado incluyen SV40, LTR de RSV, LTR de

VIH-1 y VIH-2, promotores de adenovirus, tales como la región E1A, E2A o MLP, LTR de AAV, HSV-TK y virus del sarcoma aviar.

En otros ejemplos, pueden seleccionarse promotores que están regulados en el desarrollo y están activos en células diferenciadas particulares. Por lo tanto, por ejemplo, un promotor puede no estar activo en una célula pluripotente, pero, por ejemplo, en los casos donde la célula madre pluripotente se diferencia en una célula más madura, el promotor puede estar activado.

Se emplean promotores específicos de tejido similares para efectuar la transcripción en tejidos o células específicos a fin de reducir la potencial toxicidad o los efectos no deseables para los tejidos no diana. Estos promotores pueden dar como resultado una expresión reducida, en comparación con un promotor más fuerte, tal como el promotor de CMV, pero también pueden dar como resultado una expresión más limitada e inmunogenicidad (Bojak, A., et al., 2002. Vaccine. 20:1975-79; Cazeaux., N., et al., 2002. Vaccine 20:3322-31). Por ejemplo, pueden usarse según sea adecuado promotores específicos de tejido, tales como el promotor asociado a PSA o calicreína glandular específica de próstata o el gen de creatina quinasa de músculo.

Los ejemplos de promotores específicos de tejido o específicos de diferenciación incluyen, pero sin limitación, los siguientes: B29 (linfocitos B); CD14 (células monocíticas); CD43 (leucocitos y plaquetas); CD45 (células hematopoyéticas); CD68 (macrófagos); desmina (músculo); elastasa-1 (células acinares pancreáticas); endoglina (células endoteliales); fibronectina (células en diferenciación, tejidos en curación); y Flt-1 (células endoteliales); GFAP (astrocitos).

En ciertas indicaciones, es deseable activar la transcripción en momentos específicos después de la administración del vector de terapia génica. Esto se hace con promotores tales como aquellos que son regulables por hormonas o citoquinas. Los promotores sensibles a citoquinas y proteínas inflamatorias que pueden usarse incluyen cininógeno K y T (Kageyama et al., (1987) J. Biol. Chem., 262,2345-2351), c-fos, TNF-alfa, proteína C-reactiva (Arcone, et al., (1988) Nucl. Acids Res., 16(8), 3195-3207), haptoglobina (Oliviero et al., (1987) EMBO J., 6, 1905-1912), amiloide A2 sérico, C/EBP alfa, IL-1, IL-6 (Poli y Cortese, (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 86,8202-8206), Complemento C3 (Wilson et al., (1990) Mol. Cell. Biol., 6181-6191), IL-8, glucoproteína ácida alfa-1 (Prowse y Baumann, (1988) Mol Cell Biol, 8,42-51), alfa-1 antitripsina, lipoproteína lipasa (Zechner et al., Mol. Cell. Biol., 2394-2401,1988), angiotensinógeno (Ron, et al., (1991) Mol. Cell. Biol., 2887-2895), fibrinógeno, c-jun (inducible por ésteres de forbol, TNF-alfa, radiación UV, ácido retinoico y peróxido de hidrógeno), colagenasa (inducido por ésteres de forbol y ácido retinoico), metalotioneína (inducible por metales pesados y glucocorticoides), estromelisina (inducible por éster de forbol, interleucina-1 y EGF), alfa-2 macroglobulina y alfa-1 quimiotripsina. Otros promotores incluyen, por ejemplo, SV40, MMTV, virus de la inmunodeficiencia humana (MV), virus de Moloney, ALV, virus de Epstein Barr, virus del sarcoma de Rous, actina humana, miosina, hemoglobina y creatina.

Se prevé que puede ser útil cualquiera de los promotores anteriores de manera individual o en combinación con otro, dependiendo de la acción deseada. Los promotores y otros elementos reguladores, se seleccionan de tal modo que son funcionales en las células o el tejido deseados. Además, esta lista de promotores no ha de interpretarse como exhaustiva o limitante; pueden usarse otros promotores junto con los promotores y métodos divulgados en el presente documento.

Potenciadores

Los potenciadores son elementos genéticos que aumentan la transcripción a partir de un promotor ubicado en una posición distante en la misma molécula de ADN. Los ejemplos tempranos incluyen los potenciadores asociados con los receptores de inmunoglobulina y linfocitos T que flanquean la secuencia codificante y se producen en varios intrones. Muchos promotores víricos, tales como los LTR de CMV, SV40 y retrovíricos, están estrechamente asociado con la actividad potenciadora y normalmente se tratan como elementos individuales. Los potenciadores se organizan de un modo muy parecido a los promotores. Esto es, están compuestos por varios elementos individuales, cada uno de los cuales se une a una o más proteínas transcripcionales. La distinción básica entre potenciadores y promotores se operativa. Una región potenciadora, en conjunto, estimula la transcripción a distancia y normalmente de manera independiente de la orientación; esto no es necesariamente cierto para una región promotora o sus elementos constitutivos. Por otro lado, un promotor tiene uno o más elementos que dirigen el inicio de la síntesis de ARN en un sitio particular y en una orientación particular, mientras que los potenciadores carecen de estas especificidades. Los promotores y potenciadores son a menudo solapantes y contiguos, y a menudo parece que tienen una organización modular muy similar. Un subconjunto de potenciadores es las regiones de control de locus (LCR) que no solo pueden aumentar la actividad transcripcional, sino que (junto con elementos aislantes) también ayudan a aislar el elemento transcripcional de las secuencias adyacentes cuando se integra en el genoma. Puede usarse cualquier combinación de promotor/potenciador (como según la base de datos de promotores de eucariotas EPDB) para dirigir la expresión del gen, aunque muchos restringirán la expresión a un tipo de tejido particular o a un subconjunto de tejidos (revisado en, por ejemplo, Kutzler, M.A. y Weiner, D.B., 2008. Nature Reviews Genetics 9:776-88). Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, potenciadores de las secuencias de actina, miosina, hemoglobina y creatina quinasa muscular humanas y de los virus CMV, RSV y EBV. Pueden seleccionarse potenciadores adecuados para aplicaciones particulares. Las células eucariotas pueden soportar la transcripción

citoplasmática a partir de ciertos promotores bacterianos en caso de que se proporcione la polimerasa bacteriana adecuada, ya sea como parte del complejo de suministro o como una construcción de expresión genética adicional.

Señales de poliadenilación

Cuando se emplea un inserto de ADNc, normalmente se deseará incluir una señal de poliadenilación para efectuar la poliadenilación adecuada del transcrito génico. No se cree que la naturaleza de la señal de poliadenilación sea crucial para la práctica exitosa de los presentes métodos y se emplea cualquier secuencia de este tipo, tal como las señales de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina o humana y de SV40 y señales de poliadenilación de LTR. Un ejemplo no limitante es la señal de poliadenilación de SV40 presente en el plásmido pCEP3 (Invitrogen, Carlsbad, California). Asimismo, se contempla como elemento del casete de expresión un terminador. Estos elementos pueden servir para potenciar los niveles de mensaje y para minimizar la lectura a partir del casete en otras secuencias. Las señales de terminación o de poli(A) pueden, por ejemplo, posicionarse a aproximadamente 11-30 nucleótidos cadena debajo de una secuencia conservada (AAUAAA) en el extremo 3' del ARNm (Montgomery, D.L., et al., 1993. DNA Cell Biol. 12:777-83; Kutzler, M.A. y Weiner, D.B., 2008. Nature Rev. Gen. 9:776-88).

Señales de iniciación y sitios internos de unión al ribosoma

También puede necesitarse una señal de iniciación específica para la traducción eficiente de secuencias codificantes. Estas señales incluyen el codón de inicio ATG o secuencias adyacentes. Puede ser necesario proporcionar señales de control traduccional exógenas, que incluyen el codón de iniciación ATG. El codón de iniciación se coloca en fase con el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para asegurar la traducción del inserto completo. Las señales de control traduccional y los codones de inicio pueden ser naturales o sintéticos. Puede potenciarse la eficacia de la expresión mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción adecuados.

Puede emplearse el uso elementos de sitios internos de entrada al ribosoma (IRES) para crear mensajes multigénicos o policistrónicos. Los elementos IRES son capaces de esquivar el modelo de barrido de ribosoma de traducción dependiente de remate 5' metilado y comenzar la traducción en sitios internos (Pelletier y Sonenberg, Nature, 334:320-325, 1988). Se han analizado elementos IRES de dos miembros de la familia picornavirus (polio y encefalomiocarditis) (Pelletier y Sonenberg, 1988), así como IRES de un mensaje de mamífero (Macejak y Sarnow, Nature, 353:90-94, 1991). Los elementos IRES pueden ligarse a marcos abiertos de lectura. Pueden transcribirse juntos múltiples marcos abiertos de lectura, cada uno separado por un IRES, creando mensajes policistrónicos. Debido al elemento IRES, cada marco abierto de lectura es accesible a los ribosomas para su traducción eficaz. Pueden expresarse eficazmente múltiples genes usando un solo promotor/potenciador para transcribir un solo mensaje (véanse las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.925.565 y 5.935.819).

Optimización de secuencia

También puede aumentarse la producción de proteína optimizando los codones en el transgén. Pueden usarse cambios de codones específicos de especie para aumentar la producción de proteínas. Asimismo, pueden optimizarse los codones para producir un ARN optimizado, que puede dar como resultado una traducción más eficaz. Mediante la optimización de los codones para su incorporación en el ARN, pueden eliminarse elementos tales como aquellos que dan como resultado una estructura secundaria que provoca inestabilidad, estructuras de ARNm que pueden, por ejemplo, inhibir la unión a ribosomas o secuencias críticas que pueden inhibir la exportación nuclear del ARNm (Kutzler, M.A. y Weiner, D.B., 2008. Nature Rev. Gen. 9:776-88; Yan, J. et al., 2007. Mol. Ther. 15:411-21; Cheung, Y.K., et al., 2004. Vaccine 23:629-38; Narum., D.L., et al., 2001. 69:7250-55; Yadava, A. y Ockenhouse, C.F., 2003. Infect. Immun. 71:4962-69; Smith., J.M., et al., 2004. AIDS Res. Hum. Retroviruses 20:1335-47; Zhou, W., et al., 2002. Vet. Microbiol. 88:127-51; Wu, X., et al., 2004. Biochem. Biophys. Res. Commun. 313:89-96; Zhang, W., et al., 2006. Biochem. Biophys. Res. Commun. 349:69-78; Deml, L.A., et al., 2001. J. Virol. 75:1099-11001; Schneider, R. M., et al., 1997. J. Virol. 71:4892-4903; Wang, S.D., et al., 2006. Vaccine 24:4531-40; zur Megede, J., et al., 2000. J. Virol. 74:2628-2635). Por ejemplo, pueden optimizarse las secuencias de FBP12, el polipéptido de caspasa y el CD19 mediante cambios en los codones.

Secuencias líder

Pueden añadirse secuencias líder para potenciar la estabilidad del ARNm y dar como resultado una traducción más eficaz. La secuencia líder está normalmente implicada en dirigir el ARNm al retículo endoplasmático. Los ejemplos incluyen la secuencia de señal para la glucoproteína de la envuelta del VIH-1 (Env), que retrasa su propia escisión y la secuencia líder del gen de IgE (Kutzler, M.A. y Weiner, D.B., 2008. Nature Rev. Gen. 9:776-88; Li, V., et al., 2000. Virology 272:417-28; Xu, Z.L., et al. 2001. Gene 272:149-56; Malin, A.S., et al., 2000. Microbes Infect. 2:1677-85; Kutzler, M.A., et al., 2005. J. Immunol. 175:112-125; Yang, J.S., et al., 2002. Emerg. Infect. Dis. 8:1379-84; Kumar., S., et al., 2006. DNA Cell Biol. 25:383-92; Wang, S., et al., 2006. Vaccine 24:4531-40). Puede usarse el líder de IgE para potenciar la inserción en el retículo endoplasmático (Tepler, I, et al. (1989) J. Biol. Chem. 264:5912).

Puede optimizarse y/o controlarse la expresión de los transgenes mediante la selección de métodos adecuados para

optimizar la expresión. Estos métodos incluyen, por ejemplo, optimizar promotores, métodos de suministro y secuencias génicas, (por ejemplo, como se describe en Laddy, D.J., et al., 2008. PLoS.ONE 3 e2517; Kutzler, M.A. y Weiner, D.B., 2008. Nature Rev. Gen. 9:776-88).

Ácidos nucleicos

Un "ácido nucleico", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula (una, dos o más hebras) de ADN, ARN o un derivado o análogo de los mismos, que comprende una nucleobase. Una nucleobase incluye, por ejemplo, una base de purina o pirimidina de origen natural encontrada en el ADN (por ejemplo, una adenina "A", una guanina "G", una timina "T" o una citosina "C") o el ARN (por ejemplo, una A, una G, un uracilo "U" o una C). La expresión "ácido nucleico" abarca los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido", cada uno como un subgénero del término "ácido nucleico". Los ácidos nucleicos pueden ser, ser de al menos, ser como máximo o ser de aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 441, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990 o 1000 nucleótidos o cualquier intervalo derivable en los mismos, de longitud.

Los ácidos nucleicos proporcionados en el presente documento pueden tener regiones de identidad o complementariedad con otro ácido nucleico. Se contempla que la región de complementariedad o identidad puede ser de al menos 5 residuos contiguos, aunque se contempla específicamente que la región sea, sea de al menos, como máximo o sea de aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 441, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990 o 1000 nucleótidos contiguos.

Como se usa en el presente documento, "hibridación", "hibrida" o "capaz de hibridar" pretende hacer referencia a formar una molécula bicatenaria o de triple cadena o una molécula de naturaleza bicatenaria o de triple cadena parcial. El término "alinear", como se usa en el presente documento, es sinónimo de "hibridar". El término "hibridación", "hibrida" o la expresión "capaz de hibridar" abarcan las expresiones "condiciones rigurosas" o "alta rigurosidad" y las expresiones "baja rigurosidad" o "condiciones de baja rigurosidad".

Como se usa en el presente documento, las "condiciones rigurosas" o de "alta rigurosidad" son aquellas condiciones que permiten la hibridación entre o en una o más hebras de ácido nucleico que contienen secuencias complementarias, pero impiden la hibridación de secuencias aleatorias. Las condiciones rigurosas tienen una baja tolerancia, por no decir ninguna, al desemparejamiento entre un ácido nucleico y una hebra diana. Se conocen dichas condiciones y a menudo se usan para aplicaciones que requieren alta selectividad. Las aplicaciones no limitantes incluyen aislamiento de un ácido nucleico, tal como un gen o un segmento de ácido nucleico del mismo o detectar al menos un transcrito de ARNm específico o un segmento de ácido nucleico del mismo y similares.

Las condiciones rigurosas pueden comprender condiciones de baja salinidad y/o alta temperatura, tales como las proporcionadas por NaCl de aproximadamente 0,02 M a aproximadamente 0,5 M a temperaturas de aproximadamente 42 °C a aproximadamente 70 °C. Se entiende que la temperatura y la fuerza iónica de una rigurosidad deseadas se determinan en parte por la longitud de los ácidos nucleicos particulares, la longitud y el contenido de nucleobases de las secuencias diana, la composición de carga de los ácidos nucleicos y la presencia o concentración de formamida, cloruro de tetrametilamonio u otros disolventes en una mezcla de hibridación.

Se entiende que estos intervalos, composiciones y condiciones para la hibridación se mencionan únicamente como ejemplos no limitativos y que normalmente la rigurosidad para una reacción de hibridación normalmente se determina empíricamente mediante comparación con uno o más controles positivos o negativos. Dependiendo de la aplicación prevista, pueden emplearse diversas condiciones de hibridación para lograr diversos grados de selectividad de un ácido nucleico hacia una secuencia diana. En un ejemplo no limitante, la identificación o el aislamiento de un ácido nucleico diana relacionado que no hibrida con un ácido nucleico en condiciones rigurosas puede lograrse mediante hibridación a baja temperatura y/o alta fuerza iónica. Dichas condiciones se denominan de "baja rigurosidad" o "condiciones de baja rigurosidad", y los ejemplos no limitantes de baja rigurosidad incluyen hibridación llevada a cabo con NaCl de aproximadamente 0,15 M a aproximadamente 0,9 M a un intervalo de temperatura de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 50 °C. Las condiciones de baja o alta rigurosidad pueden modificarse adicionalmente para adecuarse a una aplicación particular.

Modificación de ácidos nucleicos

Puede aplicarse cualquiera de las modificaciones analizadas más adelante a un ácido nucleico. Los ejemplos de modificaciones incluyen alteraciones en la cadena principal de ARN o ADN, azúcar o base y diversas combinaciones de los mismos. Puede modificarse cualquier número adecuado de enlaces de la cadena principal, azúcares y/o bases en un ácido nucleico (por ejemplo, independientemente, aproximadamente un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, hasta un 100 %). Un nucleósido modificado es una cualquiera de las bases adenina, citosina, guanina, timina o uracilo unidas al carbono 1' de la beta-D-ribofuranosa.

Una base modificada es una base de nucleótido distinta de adenina, guanina, citosina y uracilo en una posición 1'. Los ejemplos no limitantes de bases modificadas incluyen inosina, purina, piridin-4-ona, piridin-2-ona, fenilo, pseudouracilo, 2,4,6-trimetoxibenceno, 3-metiluracilo, dihidrouridina, naftilo, aminofenilo, 5-alquilcitidinas (por ejemplo, 5-metilcitidina), 5-alquiluridinas (por ejemplo, ribotimidina), 5-halouridina (por ejemplo, 5-bromouridina) o 6-azapirimidinas o 6-alquilpirimidinas (por ejemplo, 6-metiluridina), propina y similares. Otros ejemplos no limitantes de bases modificadas incluyen nitropirrolilo (por ejemplo, 3-nitropirrolilo), nitroindolilo (por ejemplo, 4-, 5, 6-nitroindolilo), hipoxantinilo, isoinosinilo, 2-aza-inosinilo, 7-desaza-inosinilo, nitroimidazolilo, nitropirazolilo, nitrobencimidazolilo, nitroindazolilo, aminoindolilo, pirrolopirimidinilo, difluorotolilo, 4-fluoro-6-metilbencimidazol, 4-metilbencimidazol, 3-metil isocarboestirilo, 5-metil isocarboestirilo, 3-metil-7-propinil isocarboestirilo, 7-azaindolilo, 6-metil-7-azaindolilo, imidazopiridinilo, 9-metil-imidazopiridinilo, pirrolopirizinilo, isocarboestirilo, 7-propinil isocarboestirilo, propinil-7-azaindolilo, 2,4,5-trimetilfenilo, 4-metilindolilo, 4,6-dimetilindolilo, fenilo, naftalenilo, antracenilo, fenantracenilo, pirenilo, estibenilo, tetracenilo, pentacenilo y similares.

Por ejemplo, un ácido nucleico puede comprender moléculas de ácido nucleico modificadas, con modificaciones en la cadena principal de fosfato. Los ejemplos no limitantes de modificaciones en la cadena principal de fosfato incluyen fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, fosfotriéster, morfolino, amidato, carbamato, carboximetilo, acetamidato, poliamida, sulfonato, sulfonamida, sulfamato, formacetal, tioformacetal y/o modificaciones de alquilsililo. En determinados casos, un motivo de azúcar de ribosa que se produce naturalmente en un nucleósido se reemplaza por un azúcar de hexosa, anillo heteroalquilo policíclico o grupo ciclohexenilo. En determinados casos, el azúcar de hexosa es una alosa, altrosa, glucosa, manosa, gulosa, idosa, galactosa, talosa o un derivado de los mismos. La hexosa puede ser una D-hexosa, glucosa o manosa. En determinados casos, el grupo heteroalquilo policíclico puede ser un anillo bicíclico que contiene un átomo de oxígeno en el anillo. En determinados casos, el grupo heteroalquilo policíclico es un biciclo[2.2.1]heptano, un biciclo[3.2.1]octano o un biciclo[3.3.1]nonano.

Las nucleobases de nitropirrolilo y nitroindolilo son miembros de una clase de compuestos conocidos como bases universales. Las bases universales son aquellos compuestos que pueden reemplazar a cualquiera de las cuatro bases de origen natural sin afectar sustancialmente al comportamiento o la actividad de fusión del dúplex de oligonucleótido. A diferencia de las interacciones estabilizantes de enlace de hidrógeno asociadas con las nucleobases de origen natural, los dúplex de oligonucleótido que contienen nucleobases de 3-nitropirrolilo pueden estabilizarse únicamente mediante interacciones de apilamiento. La ausencia de interacciones de enlace de hidrógeno significativas con nucleobases de nitropirrolilo obvia la especificidad para una base complementaria específica. Además, 4-, 5- y 6-nitroindolilo presentan muy poca especificidad por las cuatro bases naturales. Los procedimientos para la preparación de 1-(2'-O-metil-β-D-ribofuranosil)-5-nitroindol se analizan en Gaubert, G.; Wengel, J. Tetrahedron Letters 2004, 45, 5629. Otras bases universales incluyen hipoxantinilo, isoinosinilo, 2-aza-inosinilo, 7-desaza-inosinilo, nitroimidazolilo, nitropirazolilo, nitrobencimidazolilo, nitroindazolilo, aminoindolilo, pirrolopirimidinilo y derivados estructurales de los mismos.

El difluorotolilo es una nucleobase no natural que funciona como base universal. El difluorotolilo es un isóstero de la nucleobase natural timina. Sin embargo, a diferencia de la timina, el difluorotolilo no muestra una selectividad apreciable por cualquiera de las bases naturales. Otros compuestos aromáticos que funcionan como bases universales son 4-fluoro-6-metilbencimidazol y 4-metilbencimidazol. Además, los derivados de isocarboestirililo relativamente hidrófobos 3-metil isocarboestirililo, 5-metil isocarboestirililo y 3-metil-7-pripinil isocarboestirililo son bases universales que provocan tan solo una ligera desestabilización de los dúplex de oligonucleótidos en comparación con la secuencia de oligonucleótido que contiene solo bases naturales. Otras nucleobases no naturales incluyen 7-azaindolilo, 6-metil-7-azaindolilo, imidazopiridinilo, 9-metil-imidazopiridinilo, pirrolopirizinilo, isocarboestirilo, 7-propinil isocarboestirilo, propinil-7-azaindolilo, 2,4,5-trimetilfenilo, 4-metilindolilo, 4,6-dimetilindolilo, fenilo, naftalenilo, antracenilo, fenantracenilo, pirenilo, estibenilo, tetracenilo, pentacenilo y derivados estructurales de los mismos. Para un análisis más detallado, incluyendo procedimientos sintéticos, de difluorotolilo, 4-fluoro-6-metilbencimidazol, 4-metilbencimidazol y otras bases no naturales mencionadas anteriormente, véase: Schweitzer et al., J. Org. Chem., 59:7238-7242 (1994);

Además, pueden usarse sustituyentes químicos, por ejemplo, agentes reticulantes, para añadir estabilidad o irreversibilidad a la reacción. Los ejemplos no limitantes de agentes reticulantes incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres de ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres de disuccinimidilo, tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), maleimidas bifuncionales, tales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes tales

como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato.

Un análogo de nucleótido también puede incluir un ácido nucleico "bloqueado". Pueden usarse ciertas composiciones para esencialmente "anclar" o "bloquear" un ácido nucleico endógeno en una estructura particular. La secuencia de anclaje sirve para prevenir la desasociación de un complejo de ácido nucleico y por lo tanto, no solo puede prevenir la copia, sino que también puede permitir el marcaje, la modificación y/o la clonación de la secuencia endógena. La estructura bloqueada puede regular la expresión génica (es decir, inhibir o potenciar la transcripción o replicación) o puede usarse como una estructura estable que puede usarse para marcar o de otro modo modificar la secuencia de ácido nucleico endógena o puede usarse para aislar la secuencia endógena, es decir, para clonación.

Las moléculas de ácido nucleico no se limitan necesariamente a las moléculas que contienen únicamente ARN o ADN, sino que además abarcan nucleótidos químicamente modificados y no-nucleótidos. El porcentaje de no-nucleótidos o nucleótidos modificados puede ser del 1 % al 100 % (por ejemplo, aproximadamente un 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95 %).

Preparación de ácidos nucleicos

Puede proporcionarse un ácido nucleico para su uso como control o patrón en un ensayo o como agente terapéutico, por ejemplo. Puede producirse un ácido nucleico mediante cualquier técnica conocida en este campo, tales como, por ejemplo, síntesis química, producción enzimática o producción biológica. Pueden recuperarse o aislarse ácidos nucleicos de una muestra biológica. El ácido nucleico puede ser recombinante o puede ser natural o endógeno para la célula (producida a partir del genoma de la célula). Se contempla que puede tratarse una muestra biológica de un modo que potencie la recuperación de pequeñas moléculas de ácido nucleico. Generalmente, los métodos pueden implicar lisar células con una solución que tenga guanidinio y un detergente.

La síntesis de ácido nucleico también puede llevarse a cabo de acuerdo con métodos convencionales. Los ejemplos no limitantes de un ácido nucleico sintético (por ejemplo, un oligonucleótido sintético), incluyen un ácido nucleico preparado mediante síntesis química in vitro usando química de fosfotriéster, fosfita o fosforamidita y técnicas en fase sólida o mediante intermedios de desoxinucleósido H-fosfonato. Se han divulgado en otras partes varios mecanismos diferentes de síntesis de oligonucleótidos.

Los ácidos nucleicos pueden aislarse usando técnicas conocidas. Pueden emplearse métodos para aislar moléculas de ácido nucleico pequeñas y/o aislar moléculas de ARN. La cromatografía es un proceso usado para separar o aislar ácidos nucleicos de proteínas o de otros ácidos nucleicos. Dichos métodos pueden implicar electroforesis con una matriz de gel, columnas de filtro, precipitación con alcohol y/u otra cromatografía. En caso de que se vaya a usar o evaluar ácido nucleico de células, los métodos implican generalmente lisar las células con un caotrópico (por ejemplo, isotiocianato de guanidinio) y/o detergente (por ejemplo, N-lauroil sarcosina) antes de implementar procesos para aislar poblaciones particulares de ARN.
Los métodos pueden implicar el uso de disolventes orgánicos y/o alcohol para aislar los ácidos nucleicos. La cantidad de alcohol añadida a un lisado celular puede lograr una concentración de alcohol de aproximadamente el 55 % al 60 %. Aunque pueden emplearse diferentes alcoholes, el etanol funciona bien. Un soporte sólido puede ser cualquier estructura e incluye perlas, filtros y columnas, que pueden incluir un soporte mineral o polimérico con grupos electronegativos. Un filtro o columna de fibra de vidrio es eficaz para dichos procedimientos de aislamiento.

Un proceso de aislamiento de ácido nucleico puede incluir en ocasiones: a) lisar células en la muestra con una solución de lisado que comprende guanidinio, donde se produce un lisado con una concentración de guanidinio de al menos aproximadamente 1 M; b) extraer moléculas de ácido nucleico del lisado con una solución de extracción que comprende fenol; c) añadir al lisado una solución alcohólica para formar una mezcla de lisado/alcohol, en donde la concentración de alcohol en la mezcla es de entre aproximadamente un 35 % a aproximadamente un 70 %; d) aplicar la mezcla de lisado/alcohol a un soporte sólido; e) eluir las moléculas de ácido nucleico del soporte sólido con una solución iónica; y f) capturar las moléculas de ácido nucleico. La muestra puede secarse y resuspenderse en un líquido y volumen adecuado para su posterior manipulación.

En el presente documento se proporcionan composiciones o kits que comprenden ácidos nucleicos que comprenden los polinucleótidos de la presente invención. Por lo tanto, las composiciones o kits pueden, por ejemplo, comprender tanto el primer como el segundo polinucleótido, que codifican el primer y el segundo polipéptido quimérico. El ácido nucleico puede comprender más de una especie de ácido nucleico, es decir, por ejemplo, la primera especie de ácido nucleico comprende el primer polinucleótido y la segunda especie de ácido nucleico comprende el segundo polinucleótido. En otros ejemplos, el ácido nucleico puede comprender tanto el primer como el segundo polinucleótido. El kit puede, además, comprender el primer o el segundo ligando o ambos.

Métodos de transferencia génica

A fin de mediar el efecto de la expresión del transgén en una célula, será necesario transferir las construcciones de expresión en una célula. Dicha transferencia puede emplear métodos víricos o no víricos de transferencia génica. Esta sección proporciona un análisis de los métodos y composiciones de transferencia génica.

Se genera una célula transformada que comprende un vector de expresión introduciendo en la célula el vector de expresión. Los métodos adecuados para el suministro de polinucleótidos para la transformación de un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo para su uso con los presentes métodos incluyen prácticamente cualquier método mediante el cual puede introducirse un polinucleótido (por ejemplo, ADN) en un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo.

Puede usarse y se ha usado una célula hospedadora como receptor para vectores. Las células hospedadoras pueden proceder de procariotas o eucariotas, dependiendo de si el resultado deseado es la replicación del vector o la expresión de la totalidad o parte de las secuencias de polinucleótido codificadas por el vector. Se encuentran disponibles numerosas líneas celulares y cultivos para su uso como célula hospedadora y pueden obtenerse a través de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), que es una organización que sirve como archivo para cultivos vivos y materiales genéticos.

Puede determinarse un hospedador adecuado. En general, esto se basa en la cadena principal del vector y en el resultado deseado. Por ejemplo, puede introducirse un plásmido o cósmido en una célula hospedadora procariota para la replicación de diversos vectores. Las células bacterianas usadas como células hospedadoras para la replicación y/o expresión del vector incluyen DH5alpha, JM109 y KC8, así como una serie de hospedadores bacterianos disponibles comercialmente, tales como células competentes SURE® y células SOLOPACK Gold (STRATAGENE®, La Jolla, CA). Como alternativa, pueden usarse células bacterianas, tales como *E. coli* LE392 como células hospedadoras para virus de fagos. Las células eucariotas que pueden usarse como células hospedadoras incluyen, pero sin limitación, levaduras, de insecto y de mamífero. Los ejemplos de células hospedadoras eucariotas para la replicación y/o expresión de un vector incluyen, pero sin limitación, HeLa, NIH3T3, Jurkat, 293, COS, CHO, Saos y PC12. Los ejemplos de cepas de levadura incluyen, pero sin limitación, YPH499, YPH500 y YPH501.

Las vacunas de ácido nucleico pueden incluir, por ejemplo, vectores de ADN no vírico, ADN y ARN "desnudo" y vectores víricos. Los métodos para transformar células con estas vacunas y para optimizar la expresión de genes incluidos en estas vacunas son conocidos y se analizan en el presente documento.

Ejemplos de métodos de transferencia de ácido nucleico o de vector vírico

Puede usarse cualquier método adecuado para transfectar o transformar las células o para administrar las secuencias o composiciones de nucleótidos de los presentes métodos. En el presente documento se presentan ciertos ejemplos e incluyen además métodos tales como el suministro usando polímeros catiónicos, moléculas similares a lípidos y ciertos productos comerciales, tales como, por ejemplo, IN-VIVO-JET PEI.

Transformación ex vivo

Se encuentran disponibles varios métodos para transfectar células y tejidos vasculares extraídos de un organismo en una situación *ex vivo*. Por ejemplo, se han alterado células endoteliales caninas mediante transferencia de genes retrovíricos *in vitro* y trasplantado en un can (Wilson et al., Science, 244:1344-1346, 1989). En otro ejemplo, se transfectaron células endoteliales de minicerdos del Yucatán mediante retrovirus *in vitro* y se trasplantaron en una arteria usando un catéter de doble balón (Nabel et al., Science, 244(4910):1342-1344, 1989). Por lo tanto, se contempla que las células o tejidos pueden retirarse y transfectarse *ex vivo* usando los polinucleótidos presentados en el presente documento. En aspectos particulares, las células o tejidos trasplantados pueden colocarse en un organismo.

Inyección

Puede administrarse una célula presentadora de antígenos o un vector de ácido nucleico o vírico a un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo mediante una o más inyecciones (es decir, una inyección con aguja), tal como, por ejemplo, subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, intraprostática, intratumoral, intraperitoneal, etc. Los métodos de inyección incluyen, por ejemplo, inyección de una composición que comprende una solución salina. Los aspectos adicionales incluyen la introducción de un polinucleótido mediante microinyección directa. La cantidad del vector de expresión usada puede variar dependiendo de la naturaleza del antígeno, así como del orgánulo, célula, tejido u organismo usado.
Las inyecciones intradérmicas, intranodales o intralinfáticas son algunos de los métodos más comúnmente usados de administración de DC. La inyección intradérmica se caracteriza por una baja tasa de absorción en el torrente sanguíneo pero una rápida captación en el sistema linfático. La presencia de grandes números de células dendríticas de Langerhans en la dermis transportará antígeno intacto, así como procesado a los ganglios linfáticos drenantes. Es necesaria la preparación adecuada del sitio para llevar esto a cabo correctamente (es decir, se rasura el pelo para observar la correcta colocación de la aguja). La inyección intranodal permite el suministro directo de antígeno a los tejidos linfoides. La inyección intralinfática permite la administración directa de DC.

Electroporación

Puede introducirse un polinucleótido en un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo mediante electroporación. La electroporación implica la exposición de una suspensión de células y ADN a una descarga eléctrica de alto voltaje. En algunas variantes de este método, se emplean ciertas enzimas degradantes de la pared celular, tales como enzimas degradantes de pectina, para hacer que las células receptoras diana sean más susceptibles a la transformación mediante electroporación que las células no tratadas (Patente de los Estados Unidos n.º 5.384.253).

La transfección de células eucariotas usando electroporación ha sido bastante exitosa. Se han transfectado linfocitos pre-B de ratón con genes de inmunoglobulina kappa humanos (Potter et al., (1984) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 81, 7161-7165) y se han transfectado hepatocitos de rata con el gen de cloranfenicol acetiltransferasa (Tur-Kaspa et al., (1986) Mol. Cell Biol., 6, 716-718) de este modo.

La electroporación *in vivo* para vacunas o eVac, se implementa clínicamente mediante una técnica de inyección sencilla. Se inyecta por vía intradérmica en un paciente un vector de ADN que codifica un polipéptido. Los electrodos aplican pulsos eléctricos al espacio intradérmico provocando que las células localizadas en ese sitio, especialmente las células dendríticas dérmicas residentes, capten el vector de ADN y expresen el polipéptido codificado. Estas células que expresan polipéptido activadas por inflamación local pueden migrar posteriormente a los ganglios linfáticos, presentando antígenos, por ejemplo. Un ácido nucleico se administra electroporéticamente cuando se administra usando electroporación, después de, por ejemplo, pero sin limitación, la inyección del ácido nucleico o cualquier otro medio de administración, donde puede administrarse el ácido nucleico a las células mediante electroporación.
Se analizan métodos de electroporación en, por ejemplo, Sardesai, N.Y. y Weiner, D.B., Current Opinion in Immunotherapy 23:421-9 (2011) y Ferraro, B. et al., Human Vaccines 7:120-127 (2011).

Fosfato de calcio

Puede introducirse un polinucleótido en las células usando precipitación con fosfato de calcio. Se han transfectado células KB humanas con ADN de adenovirus 5 (Graham y ven der Eb, (1973) Virology, 52, 456-467) usando esta técnica. También de este modo, se transfectaron células L(A9) de ratón, C127 de ratón, CHO, CV-1, BHK, NIH3T3 y HeLa con un gen marcador de neomicina (Chen y Okayama, Mol. Cell Biol., 7(8):2745-2752, 1987) y se transfectaron hepatocitos de rata con una variedad de genes marcadores (Rippe et al., Mol. Cell Biol., 10:689-695, 1990).

DEAE-Dextrano

Puede administrarse un polinucleótido en una célula usando DEAE-dextrano seguido de polietilenglicol. De esta manera, se introdujeron plásmidos indicadores en células de mieloma y eritroleucemia de ratón (Gopal, T.V., *Mol Cell Biol*. mayo de 1985;5(5):1188-90).

Carga por sonicación

Aspectos adicionales incluyen la introducción de un polinucleótido mediante carga sónica directa. Se han transfectado LTK-fibroblastos con el gen de timidina quinasa mediante carga por sonicación (Fechheimer et al., (1987) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 84, 8463-8467).

Transfección mediada por liposomas

Puede atraparse un polinucleótido en un complejo lipídico, tal como, por ejemplo, un liposoma. Los liposomas son estructuras vesiculares caracterizadas por una membrana de bicapa fosfolipídica y un medio acuoso interno. Los liposomas multilamelares tienen múltiples capas de lípidos separadas por medio acuoso. Se forman espontáneamente cuando se suspenden fosfolípidos en un exceso de solución acuosa. Los componentes del lípido sufren auto-reordenamiento antes de la formación de estructuras cerradas y atrapan agua y solutos disueltos entre las bicapas lipídicas (Ghosh y Bachhawat, (1991) en: Liver Diseases, Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific Receptors and Ligands. págs. 87-104). También se contempla un polinucleótido en complejo con Lipofectamine (Gibco BRL) o Superfect (Qiagen).

Transfección mediada por receptor

Aún más, puede administrarse un polinucleótido a una célula diana mediante vehículos de suministro mediados por receptor. Estos aprovechan la captación selectiva de macromoléculas mediante endocitosis mediada por receptor que se producirá en una célula diana. En vista de la distribución específica de tipo celular de diversos receptores, este método de suministro añade otro grado de especificidad.
Ciertos vehículos de direccionamiento mediados por receptor comprenden un ligando específico de receptor celular y un agente de unión a polinucleótidos. Otros comprenden un ligando específico para receptor celular al que se ha unido operativamente el polinucleótido que se va a administrar. Se han usado varios ligandos para la transferencia

génica mediada por receptor (Wu y Wu, (1987) J. Biol. Chem., 262, 4429-4432; Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87(9):3410-3414, 1990; Perales et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:4086-4090, 1994; Myers, EPO 0273085), que establece la operabilidad de la técnica. Se ha analizado el suministro específico en el contexto de otro tipo de célula de mamífero (Wu y Wu, Adv. Drug Delivery Rev., 12:159-167, 1993). En determinados aspectos, se selecciona un ligando para que corresponda a un receptor expresado específicamente en la población de células diana. Un componente de suministro de vehículo de polinucleótido de un vehículo de direccionamiento de nucleótidos específico de células puede comprender un ligando de unión específico en combinación con un liposoma. Los polinucleótidos que se van a administrar se alojan en el liposoma y el ligando de unión específico se incorpora funcionalmente en la membrana del liposoma. Por lo tanto, el liposoma se unirá específicamente a los receptores de una célula diana y administrará el contenido a una célula. Se ha demostrado que dichos sistemas son funcionales usando sistemas en los que, por ejemplo, se usa factor de crecimiento epidérmico (EGF) en el suministro mediado por receptor de un polinucleótido a células que muestran regulación positiva del receptor de EGF.

El componente de vehículo de suministro de polinucleótido de un vehículo de suministro dirigido puede ser un liposoma en sí mismo, que puede, por ejemplo, comprender uno o más lípidos o glucoproteínas que dirigen la unión específica de células. Por ejemplo, se ha incorporado en liposomas lactosilceramida, un asialogangliósido galactosa-terminal y se ha observado un aumento en la captación del gen de insulina por hepatocitos (Nicolau et al., (1987) Methods Enzymol., 149, 157-176). Se contempla que las construcciones de transformación específicas de tejido pueden administrarse específicamente en una célula diana de un modo similar.

Bombardeo de microproyectiles

Pueden usarse técnicas de bombardeo con microproyectiles para introducir un polinucleótido en al menos un orgánulo, célula, tejido u organismo (Patente de los Estados Unidos n.º 5.550.318; Patente de los Estados Unidos n.º 5.538.880; Patente de los Estados Unidos n.º 5.610.042; y Solicitud PCT WO 94/09699). Este método depende de la capacidad para acelerar microproyectiles recubiertos de ADN a alta velocidad, permitiéndoles perforar las membranas celulares y entrar en las células sin eliminarlas (Klein et al., (1987) Nature, 327, 70-73). Se conoce en la técnica una gran variedad de técnicas de bombardeo con microproyectiles, muchas de las cuales son aplicables a los presentes métodos.
En este bombardeo con microproyectiles, pueden recubrirse una o más partículas con al menos un polinucleótido y suministrarse a las células por una fuerza propulsora. Se han desarrollado varios dispositivos para acelerar partículas pequeñas. Uno de dichos dispositivos se basa en una descarga de alto voltaje para generar una corriente eléctrica, que a su vez proporciona la fuerza motriz (Yang et al., (1990) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 87, 9568-9572). Los microproyectiles usados han consistido en sustancias biológicamente inertes, tales como partículas o perlas de wolframio u oro. Las partículas ejemplares incluyen aquellas formadas por wolframio, platino y, en determinados ejemplos, oro, incluyendo, por ejemplo, nanopartículas. Se contempla que en algunos casos puede no ser necesaria la precipitación de ADN sobre partículas de metal para el suministro de ADN a una célula receptora usando bombardeo de microproyectiles. Sin embargo, se contempla que las partículas pueden contener ADN en lugar de estar recubiertas con ADN. Las partículas recubiertas de ADN pueden aumentar el nivel de suministro de ADN mediante el bombardeo de partículas pero no son, en sí, necesarias.

Ejemplos de métodos de transferencia mediada por vector vírico

Cualquier vector vírico adecuado para administrar secuencias de nucleótidos o composiciones que comprenden secuencias de nucleótidos, a una célula o a un sujeto, tales como la célula o las células en el sujeto que pueden expresar los genes codificados por las secuencias de nucleótidos, puede emplearse en los presentes métodos. Puede incorporarse un transgén en una partícula vírica para mediar la transferencia génica a una célula. Típicamente, el virus estará simplemente expuesto a la célula hospedadora adecuada en condiciones fisiológicas, permitiendo la captación del virus. Los presentes métodos se emplean ventajosamente usando una variedad de vectores víricos, como se analiza a continuación.

Adenovirus

Los adenovirus son particularmente adecuados para su uso como vector de transferencia génica debido a su genoma de ADN de tamaño medio, facilidad de manipulación, alto título, amplio intervalo de células diana y alta infectividad. El genoma vírico de aproximadamente 36 kb está rodeado por repeticiones terminales invertidas (ITR) de 100-200 pares de bases (pb), en las que están contenidos los elementos de acción en cis necesarios para la replicación y el empaquetado del ADN vírico. Las regiones tempranas (E) y tardías (L) del genoma que contienen diferentes unidades de transcripción se dividen por el inicio de la replicación del ADN vírico.
La región E1 (E1A y E1B) codifica proteínas responsables para la regulación de la transcripción del genoma vírico y unos cuantos genomas celulares. La expresión de la región E2 (E2A y E2B) da como resultado la síntesis de las proteínas para la replicación de ADN vírico. Estas proteínas están implicadas en la replicación del ADN, la expresión tardía de genes y la desconexión de la célula hospedadora (Renan, M. J. (1990) Radiother Oncol., 19, 197-218). Los productos de los genes tardíos (L1, L2, L3, L4 y L5), que incluyen la mayoría de las proteínas de la cápside vírica, se expresan únicamente después de un procesamiento significativo de un solo transcrito primario proporcionado por el

promotor tardío mayor (MLP). El MLP (ubicado a 16,8 unidades de mapa) es particularmente eficaz durante la fase tardía de la infección y todos los ARNm editados a partir de este promotor poseen una secuencia líder tripartita (TL) 5', que los hace útiles para la traducción.

A fin de optimizar el adenovirus para terapia génica, es necesario maximizar la capacidad de carga, de tal forma que puedan incluirse grandes segmentos de ADN. También es altamente deseable reducir la toxicidad y la reacción inmunológica asociada con ciertos productos adenovíricos. Los objetivos son, hasta cierto punto, colindantes, en tanto que la eliminación de los genes adenovíricos sirve para ambos extremos. Mediante la práctica de los presentes métodos, es posible lograr estos dos objetivos, conservando la capacidad para manipular las construcciones terapéuticas con relativa facilidad.

Este gran desplazamiento de ADN es posible debido a que los elementos en cis necesarios para la replicación del ADN se localizan en las repeticiones terminales invertidas (ITR) (100-200 pb) en cualquiera de los dos extremos del genoma vírico lineal. Los plásmidos que contienen ITR pueden replicarse en presencia de un adenovirus no defectuoso (Hay, R.T., et al., J Mol Biol. 5 de junio de 1984; 175(4):493-510). Por lo tanto, la inclusión de estos elementos en un vector adenovírico puede permitir la replicación.

Además, la señal de empaquetado para la encapsulación vírica se localiza entre 194-385 pb (0,5-1,1 unidades de mapa) en el extremo izquierdo del genoma vírico (Hearing et al., J. (1987) Virol., 67, 2555-2558). La señal imita al sitio de reconocimiento de proteínas en el ADN de bacteriófago lambda, donde una secuencia específica próxima al extremo izquierdo, pero fuera de la secuencia de extremo cohesivo, media la unión a proteínas que son necesarias para la inserción del ADN en la estructura de cabeza. Los vectores de sustitución de E1 de Ad han demostrado que un fragmento de 450 pb (0-1,25 unidades de mapa) en el extremo izquierdo del genoma vírico podría dirigir el empaquetamiento directo en células 293 (Levrero et al., *Gene*, 101:195-202, 1991).

Anteriormente, se ha demostrado que ciertas regiones del genoma adenovírico pueden incorporarse en el genoma de células de mamífero y de este modo expresarse los genes codificados. Estas líneas celulares son capaces de soportar la replicación de un vector adenovírico que es deficiente en la función adenovírica codificada por la línea celular. También ha habido informes de complementación de vectores adenovíricos deficientes para replicación mediante vectores "colaboradores", por ejemplo, virus de tipo silvestre o mutantes condicionalmente defectuosos.

Los vectores adenovíricos deficientes para replicación pueden complementarse, en trans, por virus colaboradores. Esta observación por sí misma no permite el aislamiento de los vectores deficientes para replicación, sin embargo, debido a la presencia del virus colaborador, necesario para proporcionar funciones replicativas, se podría contaminar cualquier preparación. Por lo tanto, se necesitó un elemento adicional que pudiera añadir especificidad a la replicación y/o empaquetado del vector deficiente para replicación. Este elemento procede de la función empaquetadora del adenovirus.
Se ha demostrado que la señal de empaquetado para adenovirus existe en el extremo izquierdo del mapa de adenovirus convencional (Tibbetts et al. (1977) Cell, 12.243-249). Estudios posteriores demostraron que un mutante con una eliminación en la región E1A (194-358 pb) del genoma crecían mal incluso en una línea celular que complementaba la función temprana (E1A) (Hearing y Shenk, (1983) J. Mol. Biol. 167.809-822). Cuando se recombinó un ADN adenovírico compensatorio (0-353 pb) en el extremo derecho del mutante, el virus se empaquetó normalmente. Un análisis mutacional adicional identificó un elemento corto, repetido, dependiente de la posición en el extremo izquierdo del genoma de Ad5. Se observó que una copia de la repetición era suficiente para el empaquetado eficaz, en caso de estar presente en cualquiera de los dos extremos del genoma, pero no cuando se movió hacia el interior de la molécula de ADN de Ad5 (Hearing et al., J. (1987) Virol., 67, 2555-2558).

Mediante el uso de versiones mutadas de la señal de empaquetamiento, es posible crear virus colaboradores que se empaquetan con diversas eficacias. Típicamente, las mutaciones son mutaciones o eliminaciones puntuales. Cuando se cultivan virus colaboradores con baja eficacia de empaquetado en células colaboradoras, se empaqueta el virus, aunque a velocidades reducidas en comparación con el virus de tipo silvestre, permitiendo de este modo la propagación del colaborador. Cuando se cultivan estos virus colaboradores en células junto con virus que contiene señales de empaquetado de tipo silvestre, sin embargo, las señales de empaquetado de tipo silvestre son reconocidas preferencialmente frente a las versiones mutadas. Dada la cantidad limitante de factor de empaquetamiento, el virus que contiene las señales de tipo silvestre se empaqueta selectivamente cuando se compara con los colaboradores. En caso de que la preferencia sea lo suficientemente elevada, pueden lograrse soluciones madre que se aproximan a la homogeneidad.

Para mejorar el tropismo de las construcciones de ADV por tejidos o especies particulares, las secuencias de fibra de unión a receptor pueden sustituirse normalmente entre aislados adenovíricos. Por ejemplo, puede sustituirse la secuencia de fibra de unión a CD46 del adenovirus 35 por el ligando de unión a receptor de adenovirus Coxackie (CAR) encontrado en el adenovirus 5, produciendo virus con afinidad de unión altamente mejorada por las células hematopoyéticas humanas. El virus "pseudotipado resultante", Ad5f35, ha sido la base para varios aislados víricos desarrollados clínicamente. Además, existen varios métodos bioquímicos para modificar la fibra para permitir el redireccionamiento del virus a células diana. Los métodos incluyen el uso de anticuerpos bifuncionales (uniéndose un extremo al ligando de CAR y uniéndose un extremo a la secuencia diana) y la biotinilación de la fibra para permitir

la asociación con ligandos quiméricos a base de avidina personalizados. Como alternativa, se pueden unir ligandos (por ejemplo, anti-CD205 mediante enlazadores heterobifuncionales (por ejemplo, que contienen PEG), a la partícula de adenovirus.

Retrovirus

Los retrovirus forman parte de un grupo de virus de ARN monocatenarios caracterizados por su capacidad para convertir su ARN en ADN bicatenario en células infectadas mediante un proceso de retrotranscripción (Coffin, (1990) en: Virology, ed., Nueva York: Raven Press, págs. 1437-1500). El ADN resultante después se integra de manera estable en los cromosomas celulares en forma de un provirus y dirige la síntesis de proteínas víricas. La integración da como resultado la retención de las secuencias génicas víricas en la célula receptora y sus descendientes. El genoma retrovírico contiene tres genes - gag, pol y env - que codifican las proteínas de la cápside, la enzima polimerasa y componentes de la envuelta, respectivamente. Una secuencia hallada cadena arriba del gen gag, denominada psi, funciona como señal para el empaquetamiento del genoma en viriones. Hay dos secuencias de repetición terminal larga (LTR) en los extremos 5' y 3' del genoma vírico. Estos contienen secuencias promotoras y potenciadoras fuertes y también son necesarios para la integración en el genoma de la célula hospedadora (Coffin, 1990). Por lo tanto, por ejemplo, la presente tecnología incluye, por ejemplo, células en las que el polinucleótido usado para transducir la célula se integra en el genoma de la célula.

A fin de construir un vector retrovírico, se inserta un ácido nucleico que codifica un promotor en el genoma vírico en lugar de ciertas secuencias víricas para producir un virus que es defectuoso para la replicación. A fin de producir viriones, se construye una línea celular empaquetadora que contiene los genes gag, pol y env pero sin los componentes de LTR y psi (Mann et al., (1983) Cell, 33, 153-159). Cuando se introduce un plásmido recombinante que contiene un ADNc humano, junto con las secuencias de LTR y psi retrovíricas, en esta línea celular (mediante, por ejemplo, precipitación por fosfato de calcio), la secuencia psi permite que el transcrito de ARN del plásmido recombinante se empaquete en partículas víricas, que después se secretan en el medio de cultivo (Nicolas, J.F. y Rubenstein, J.L.R., (1988) En: Vectors: a Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Rodriquez y Denhardt, Eds.). Nicolas y Rubenstein; Temin et al., (1986) En: Gene Transfer, Kucherlapati (ed.) y Nueva York: Plenum Press, págs. 149-188; Mann et al., 1983). El medio que contiene los retrovirus recombinantes se recoge, opcionalmente se concentra y se usa para la transferencia génica. Los vectores retrovíricos son capaces de infectar a una gran variedad de tipos celulares. Sin embargo, la integración y expresión estable de muchos tipos de retrovirus requiere la división de las células hospedadoras (Paskind et al., (1975) Virology, 67.242-248).
Recientemente se desarrolló una estrategia diseñada para permitir el direccionamiento específico de vectores retrovíricos basada en la modificación química de un retrovirus mediante la adición química de motivos de galactosa a la envuelta vírica. Esta modificación puede permitir la infección específica de células, tales como hepatocitos, mediante receptores de asialoglucoproteína, puede ser deseable.
Se diseñó una estrategia diferente al direccionamiento de retrovirus recombinantes, que usó anticuerpos biotinilados contra una proteína de la envuelta retrovírica y contra un receptor celular específico. Los anticuerpos se acoplaron a través de los componentes de biotina usando estreptavidina (Roux et al., (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 86, 9079-9083). Se demostró con un virus ecotrópico *in vitro* la infección de una variedad de células humanas que portan estos antígenos de superficie usando anticuerpos contra antígenos de clase I y clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (Roux et al., 1989).

Virus adenoasociados

AAV utiliza un ADN lineal monocatenario de aproximadamente 4700 pares de bases. Las repeticiones terminales invertidas flanquean el genoma. Hay dos genes presentes en el genoma, que dan lugar a una serie de productos génicos distintos. El primero, el gen cap, produce tres proteínas viriónicas diferentes (VP), denominadas VP-1, VP-2 y VP-3. El segundo, el gen rep, codifica cuatro proteínas no estructurales (NS). Uno o más de estos productos génicos de rep es responsable de la transcripción de AAV transactivante.

Los tres promotores en AAV se designan por su ubicación, en unidades de mapa, en el genoma. Estos son, de izquierda a derecha, p5, p19 y p40. La transcripción da lugar a seis transcritos, dos iniciados en cada uno de los tres promotores, encontrándose uno de cada par cortado y empalmado. El sitio de corte y empalme, obtenido de las unidades de mapa 42-46, es igual para cada transcrito. Las cuatro proteínas no estructurales proceden aparentemente del más largo de los transcritos y las tres proteínas viriónicas surgen del transcrito más pequeño.

AAV no se asocia con ninguna patología en seres humanos. De forma interesante, para una replicación eficiente, AAV requiere funciones "colaboradoras" de virus, tales como el virus del herpes simple I y II, citomegalovirus, virus de la seudorrabia y, por supuesto, adenovirus. El mejor caracterizado de los colaboradores es el adenovirus y se ha demostrado que muchas funciones "tempranas" para este virus ayudan en la replicación del AAV. Se cree que la expresión a bajo nivel de las proteínas rep de AAV mantiene bajo control la expresión estructural de AAV y se cree que la infección con virus colaborador elimina este bloqueo.

Las repeticiones terminales del vector AAV pueden obtenerse mediante digestión con endonucleasa de restricción de AAV o un plásmido, tal como p201, que contiene un genoma de AAV modificado (Samulski et al., J. Virol.,

61:3096-3101 (1987)) o mediante otros métodos, incluyendo, pero sin limitación, síntesis química o enzimática de las repeticiones terminales basándose en la secuencia de AAV publicada. Puede determinarse, por ejemplo, mediante análisis de eliminación, la secuencia mínima o parte de los ITR de AAV que se necesita para permitir la función, es decir, integración estable y de sitio específico. También puede determinarse qué modificaciones menores de la secuencia pueden tolerarse a la vez que se mantiene la capacidad de las repeticiones terminales para dirigir la integración estable específica de sitio.

Los vectores basados en AAV han demostrado ser vehículos eficaces y seguros para el suministro de genes *in vitro* y se están desarrollando estos vectores y evaluando en etapas preclínicas y clínicas para una gran variedad de aplicaciones de terapia génica potencial, tanto *ex vivo* como *in vivo* (Carter y Flotte, (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci., 770; 79-90; Chatteijee, et al., (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci., 770,79-90; Ferrari et al., (1996) J. Virol., 70,3227-3234; Fisher et al., (1996) J. Virol., 70.520-532; Flotte et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 90,10613-10617, (1993); Goodman et al. (1994), Blood, 84,1492-1500; Kaplitt et al., (1994) Nat'l Genet., 8.148-153; Kaplitt, M.G., et al., Ann Thorac Surg. diciembre de 1996;62(6):1669-76; Kessler et al., (1996) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 93,14082-14087; Koeberl et al., (1997) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 94,1426-1431; Mizukami et al., (1996) Virology, 217.124-130).

La eficiente transferencia génica mediada por AAV y su expresión en el pulmón ha dado lugar a ensayos clínicos para el tratamiento de la fibrosis quística (Carter y Flotte, 1995; Flotte et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 90, 10613-10617, (1993)). De manera similar, las perspectivas de tratamiento de la distrofia muscular mediante suministro génico mediado por AAV del gen de distrofina al músculo esquelético, de la enfermedad de Parkinson mediante el suministro del gen de tirosina hidroxilasa al cerebro, de la hemofilia B mediante el suministro del gen de Factor IX al hígado y potencialmente del infarto de miocardio mediante el gen de factor de crecimiento endotelial vascular al corazón, parecen prometedoras ya que recientemente se ha demostrado que la expresión transgénica mediada por AAV en estos órganos es altamente eficaz (Fisher et al., (1996) J. Virol., 70.520-532; Flotte et al., 1993; Kaplitt et al., 1994; 1996; Koeberl et al., 1997; McCown et al., (1996) Brain Res.,713,99-107; Ping et al., (1996) Microcirculation, 3.225-228; Xiao et al., (1996) J. Virol., 70,8098-8108).

Otros vectores víricos

Se emplean otros vectores víricos como construcciones de expresión en los presentes métodos y composiciones. Pueden emplearse vectores procedentes de virus tales como el virus vaccinia (Ridgeway, (1988) en: Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses, págs. 467-492; Baichwal y Sugden, (1986) en, Gene Transfer, págs. 117-148; Coupar et al., Gene, 68:1-10, 1988), el virus de la viruela del canario y el virus del herpes. Estos virus ofrecen varias características para su uso en la transferencia génica en varias células de mamífero.

Una vez que se ha suministrado la construcción a la célula, el ácido nucleico que codifica el transgén se posiciona y expresa en diferentes sitios. El ácido nucleico que codifica el transgén puede integrarse de manera estable en el genoma de la célula. Esta integración se produce en la ubicación y orientación afín mediante recombinación de homólogos (reemplazo génico) o se integra en una ubicación aleatoria no específica (aumento génico). Es más, el ácido nucleico puede mantenerse de manera estable en la célula en forma de un segmento de ADN episómico separado. Dichos segmentos de ácido nucleico o "episomas" codifican secuencias suficientes para permitir el mantenimiento y la replicación independiente de o de manera sincronizada con el ciclo de la célula hospedadora. El modo en que se suministra la construcción de expresión a una célula y en qué parte de la célula permanece el ácido nucleico depende del tipo de construcción de expresión empleado.

Métodos para tratar una enfermedad

Los presentes métodos también abarcan métodos de tratamiento o prevención de una enfermedad donde la administración de células mediante, por ejemplo, infusión, puede ser beneficiosa.

Pueden usarse células, tales como, por ejemplo, linfocitos T, linfocitos infiltrantes en tumores, linfocitos citolíticos naturales, linfocitos T citolíticos naturales o células progenitoras, tales como, por ejemplo, células madre hematopoyéticas, células estromales mesenquimales, células madre, células madre pluripotentes y células madre embrionarias para terapia génica. Las células pueden proceder de un donante o pueden ser células obtenidas del paciente. Las células pueden usarse, por ejemplo, en regeneración, por ejemplo, para reemplazar la función de células enfermas. Las células también pueden modificarse para expresar un gen heterólogo, de tal forma que pueden administrarse agentes biológicos a microambientes específicos tales como, por ejemplo, médula ósea enferma o depósitos metastásicos. También se han usado células estromales mesenquimales, por ejemplo, para proporcionar actividad inmunosupresora y pueden usarse en el tratamiento de la enfermedad de injerto contra hospedador y de trastornos inmunitarios. Las células proporcionadas en la presente divulgación contienen un interruptor de seguridad que puede ser valioso en una situación donde después de la terapia celular, se necesita aumentar o reducir la actividad de las células terapéuticas. Por ejemplo, cuando se administran al paciente linfocitos T que expresan un receptor de antígeno quimérico, en algunas situaciones puede haber un evento adverso, tal como toxicidad fuera de la diana. La interrupción de la administración del ligando podría devolver a los linfocitos T terapéuticos a un estado no activado, permaneciendo a un bajo nivel de expresión no tóxico. Sin embargo, por ejemplo, la célula terapéutica puede funcionar para reducir las células tumorales o el tamaño tumoral y puede dejar

de ser necesaria. En esta situación, puede interrumpirse la administración del ligando y las células terapéuticas dejarían de estar activadas. En caso de que retornen las células tumorales o de que aumente el tamaño tumoral después de la terapia inicial, puede administrarse nuevamente el ligando, a fin de activar a los linfocitos T que expresan el receptor de antígeno quimérico y volver a tratar al paciente.

Por "célula terapéutica" se entiende una célula usada para terapia celular, es decir, una célula administrada a un sujeto para tratar o prevenir una afección o enfermedad. En dichos casos, cuando las células tienen un efecto negativo, pueden usarse los presentes métodos para eliminar las células terapéuticas mediante apoptosis selectiva.

En otros ejemplos, se usan linfocitos T para tratar diversas enfermedades y afecciones y como parte de un trasplante de células madre. Un evento adverso que puede producirse después del trasplante de linfocitos T haploidénticos es la enfermedad de injerto contra hospedador (GvHD). La probabilidad de que se produzca la GvHD aumenta a medida que aumenta el número de linfocitos T que se trasplantan. Esto limita el número de linfocitos T que pueden infundirse. Al tener la capacidad para eliminar de manera selectiva los linfocitos T infundidos en caso de GvHD en el paciente, puede infundirse un mayor número de linfocitos T, aumentando el número a más de 10^6, más de 10^7, más de 10^8 o más de 10^9 células. El número de linfocitos T/kg de peso corporal que puede administrarse puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 1 x 10^4 T células/kg de peso corporal a aproximadamente 9 x 10^7 T células/kg de peso corporal, por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 x 10^4; aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 x 10^5; aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 x 10^6; o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 x 10^7 linfocitos T/kg de peso corporal. En otros ejemplos, pueden usarse células terapéuticas distintas de linfocitos T. El número de células terapéuticas/kg de peso corporal que puede administrarse puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 1 x 10^4 T células/kg de peso corporal a aproximadamente 9 x 10^7 T células/kg de peso corporal, por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 x 10^4; aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 x 10^5; aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 x 10^6; o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 x 10^7 células terapéuticas/kg de peso corporal.

La expresión "dosis unitaria", al referirse al inóculo, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para mamíferos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de composición farmacéutica calculada para producir el efecto inmunogénico deseado en asociación con el diluyente necesario. Las especificaciones para la dosis unitaria de un inóculo están dictadas por y dependen de las características únicas de la composición farmacéutica y del efecto inmunológico particular que se va a lograr.

Una cantidad eficaz de la composición farmacéutica, tal como el ligando multimérico presente en el presente documento, puede ser la cantidad que logra este resultado seleccionado de eliminar de manera selectiva las células que incluyen el vector de Caspasa-9, de tal forma que más de un 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 97 % de las células que expresan Caspasa-9 son eliminadas. El término también es sinónimo de "cantidad suficiente".
La cantidad eficaz para cualquier aplicación particular puede variar dependiendo de factores tales como la enfermedad o afección que se vaya a tratar, la composición particular que se esté administrando, el tamaño del sujeto y/o la gravedad de la enfermedad o afección. Se puede determinar empíricamente la cantidad eficaz de una composición particular presentada en el presente documento sin necesitar experimentación indebida.

Los términos "contraído" y "expuesto", cuando se aplican a una célula, tejido u organismo, se usan en el presente documento para analizar los procesos mediante los que la composición farmacéutica y/u otro agente, tal como, por ejemplo, un agente quimioterapéutico o radioterapéutico, se administran a una célula diana, tejido u organismo o se colocan en yuxtaposición directa con la célula diana, tejido u organismo. Para lograr la eliminación o la estasis celular, la composición farmacéutica y/o los agentes adicionales se administran a una o más células en una cantidad combinada eficaz para eliminar las células o impedir su división. La administración de la composición farmacéutica puede preceder, ser concurrente con y/o ir seguida de los otros agentes a intervalos que van de minutos a semanas. En los casos donde se aplican la composición farmacéutica y otros agentes por separado a una célula, tejido u organismo, generalmente se aseguraría que no transcurra un periodo de tiempo significativo entre los tiempos de cada administración, de tal forma que la composición farmacéutica y los agentes sigan siendo capaces de ejercer un efecto ventajosamente combinado en la célula, tejido u organismo. Por ejemplo, en tales casos, se contempla que se puede poner en contacto la célula, tejido u organismo con dos, tres, cuatro o más modalidades de manera sustancialmente simultánea (es decir, en menos de aproximadamente un minuto) con la composición farmacéutica. En otros aspectos, pueden administrarse uno o más agentes de manera sustancialmente simultánea, de aproximadamente 1 minuto, a aproximadamente 24 horas a aproximadamente 7 días a aproximadamente 1 a aproximadamente 8 semanas o más y cualquier intervalo intermedio derivable, antes y/o después de la administración del vector de expresión. Es más, pueden emplearse varios regímenes combinados de la composición farmacéutica presentada en el presente documento y uno o más agentes.

Tratamiento terapéutico optimizado y personalizado

La inducción de la apoptosis después de la administración del dímero puede optimizarse determinando el estadio de la enfermedad de injerto contra hospedador o del número de células terapéuticas no deseadas que permanecen en el paciente.

Por ejemplo, la determinación de que un paciente tiene GvHD y del estadio de la GvHD, proporciona una indicación a un profesional clínico de que puede ser necesario inducir la apoptosis asociada con Caspasa-9 mediante la administración del ligando multimérico. En otro ejemplo, la determinación de que un paciente tiene un nivel de GvHD reducido después del tratamiento con el ligando multimérico puede indicar al profesional clínico que no se necesita una dosis adicional del ligando multimérico. De manera similar, después del tratamiento con el ligando multimérico, la determinación de que el paciente continúa mostrando síntomas de GvHD o de que padece una recidiva de la GvHD puede indicar al profesional clínico que puede ser necesario administrar al menos una dosis adicional de ligando multimérico. Se pretende que el término "dosis" incluya tanto la cantidad de la dosis como la frecuencia de administración, tal como, por ejemplo, el tiempo de la siguiente dosis.

Después de la administración de células terapéuticas, por ejemplo, células terapéuticas que expresan un receptor de antígeno quimérico además del polipéptido de Caspasa-9 inducible, en caso de que se necesite reducir el número de células modificadas o de células modificadas *in vivo*, puede administrarse el ligando multimérico al paciente. En estos casos, los métodos comprenden determinar la presencia o ausencia de un síntoma negativo o afección, tal como enfermedad de injerto contra hospedador o toxicidad fuera de la diana y administrar una dosis del ligando multimérico. Los métodos pueden comprender además monitorizar el síntoma o la afección y administrar una dosis adicional del ligando multimérico en caso de que persista el síntoma o la afección. Esta pauta de monitorización y tratamiento puede continuar mientras que permanezcan las células terapéuticas que expresan receptores de antígenos quiméricos o moléculas de señalización quiméricas dentro del paciente.

Puede proporcionarse de cualquier modo conveniente una indicación para ajustar o mantener una dosis de fármaco posterior, tal como, por ejemplo, una dosis posterior del ligando multimérico y/o la dosis de fármaco siguiente. Puede proporcionarse una indicación en forma de tabla (por ejemplo, en un medio físico o electrónico). Por ejemplo, los síntomas de enfermedad de injerto contra hospedador pueden proporcionarse en una tabla y un profesional clínico puede comparar los síntomas con una lista o tabla de los estadios de la enfermedad. Después, el profesional clínico puede identificar a partir de la tabla una indicación para la dosis de fármaco siguiente. Puede presentarse una indicación (por ejemplo, mostrarse) por un ordenador, después de proporcionarse los síntomas o el estadio de la GvHD al ordenador (o introducirse en la memoria en el ordenador). Por ejemplo, puede proporcionarse esta información a un ordenador (por ejemplo, introducirse en la memoria por un usuario o transmitirse a un ordenador a partir de un dispositivo remoto en una red informática) y un programa informático en el ordenador puede generar una indicación para ajustar o mantener una dosis de fármaco posterior y/o proporcionar la cantidad de dosis de fármaco posterior.

Una vez que se ha determinado una dosis posterior basándose en la indicación, un profesional clínico puede administrar la dosis posterior o proporcionar instrucciones para ajustar la dosis para otra persona o entidad. La expresión "profesional clínico", como se usa en el presente documento, puede referirse a un ente a cargo de la toma de decisiones y un profesional clínico es un profesional médico. Un ente a cargo de tomar decisiones puede ser un ordenador o una salida de un programa informático presentado y un profesional sanitario puede actuar siguiendo las indicaciones o la dosis de fármaco posterior mostrada por el ordenador. Un ente a cargo de tomar decisiones puede administrar directamente la dosis posterior (por ejemplo, infundir la dosis siguiente en el sujeto) o de manera remota (por ejemplo, pueden cambiarse los parámetros de la bomba de manera remota por un ente a cargo de tomar decisiones).

En algunos ejemplos, se puede administrar una dosis o múltiples dosis del ligando antes de que sean evidentes las manifestaciones clínicas de la GvHD u otros síntomas, tales como síntomas de CRS. En este ejemplo, se termina la terapia celular antes de la aparición de síntomas negativos. Por ejemplo, en caso de un trasplante de células hematopoyéticas para el tratamiento de una enfermedad genética, puede terminarse la terapia después de que el trasplante haya progresado a injerto, pero antes de que pueda producirse GvHD clínicamente observable u otros síntomas negativos. En otros ejemplos, puede administrarse el ligando para eliminar las células modificadas a fin de eliminar las células en la diana/fuera de la diana, tal como, por ejemplo, linfocitos B sanos que coexpresan el antígeno diana asociado con linfocitos B.

Los métodos como se presentan en el presente documento incluyen, sin limitación, el suministro de una cantidad eficaz de una célula activada, un ácido nucleico o una construcción de expresión que codifica la misma. Una "cantidad eficaz" de la composición farmacéutica, en general, se define como aquella cantidad suficiente para lograr de manera detectable y repetida el resultado deseado indicado, por ejemplo, mejorar, reducir, minimizar o limitar el alcance de la enfermedad o sus síntomas. Pueden aplicarse otras definiciones más rigurosas, incluyendo la eliminación, erradicación o cura de la enfermedad. En algunos casos, puede haber una etapa de monitorización de los biomarcadores para evaluar la eficacia del tratamiento y para controlar la toxicidad.

Control dual de células terapéuticas y control con heterodimerizador de la apoptosis para una terapia controlada

Los ácidos nucleicos y las células proporcionados en el presente documento pueden usarse para lograr el control dual de células terapéuticas para una terapia controlada. Por ejemplo, puede diagnosticarse al sujeto una afección, tal como un tumor, donde hay necesidad de administrar la terapia dirigida al receptor de antígeno quimérico. Los métodos analizados en el presente documento proporcionan varios ejemplos de formas para controlar la terapia a fin

de inducir la actividad de las células terapéuticas que expresan CAR y también para proporcionar un interruptor de seguridad en caso de que haya necesidad de detener completamente la terapia o de reducir el número o el porcentaje de las células terapéuticas en el sujeto.

En ciertos ejemplos, se administran linfocitos T modificados a un sujeto que expresan los siguientes polipéptidos: 1. Un polipéptido quimérico (iMyD88/CD40 o "iMC") que comprende dos o más regiones de unión a ligando FKBP12 y un polipéptido o polipéptidos coestimuladores, tal como, por ejemplo, MyD88 o MyD88 truncado y CD40; 2. Un polipéptido proapoptótico quimérico que comprende una o más regiones de unión a ligando FRB y un polipéptido de Caspasa-9; 3. Un polipéptido de receptor de antígeno quimérico que comprende un motivo de reconocimiento de antígeno que se une a un antígeno diana. En este ejemplo, el antígeno diana es un antígeno tumoral presente en células tumorales en el sujeto. Tras la administración, puede administrarse el ligando AP1903 al sujeto, que induce la activación de iMC del linfocito CAR T. La terapia se monitoriza, por ejemplo, puede evaluarse el tamaño o el crecimiento tumoral durante el transcurso de la terapia. Pueden administrarse una o más dosis del ligando durante el transcurso de la terapia.

La terapia puede modularse interrumpiendo la administración de AP1903, que puede reducir el nivel de activación del linfocito CAR-T. Para interrumpir la terapia con linfocitos CAR-T, puede activarse el polipéptido de Caspasa-9 de interruptor de seguridad administrando un rapálogo, que se une a la región de unión a ligando de FRB. La cantidad y la pauta de dosificación del rapálogo puede determinarse basándose en el nivel de terapia con linfocitos CAR-T que se necesita. Como interruptor de seguridad, la dosis del rapálogo es una cantidad eficaz para eliminar al menos un 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % de las células modificadas administradas. En otros ejemplos, la dosis es una cantidad eficaz para retirar hasta un 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90, 95 % o 100 % de las células que expresan el polipéptido de caspasa quimérico, en caso de que se necesite reducir el nivel de terapia con linfocitos CAR-T, pero no detener completamente la terapia. Esto puede medirse, por ejemplo, obteniendo una muestra del sujeto antes de inducir el interruptor de seguridad, antes de administrar la rapamicina o el rapálogo y obtener una muestra después de la administración de la rapamicina o el rapálogo, a las, por ejemplo, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 horas o 1, 2, 3, 4, 5 días después de la administración y comparando el número o la concentración de células que expresan caspasa quimérica entre las dos muestras mediante, por ejemplo, cualquier método disponible, incluyendo, por ejemplo, detectando la presencia de un marcador. Este método para determinar el porcentaje de eliminación de las células también puede usarse cuando el ligando inductor es AP1903 o se une a la región de multimerización FKBP12 o FKBP12 variante.

En algunos ejemplos, el polipéptido quimérico MyD88/CD40 inducible también comprende el receptor de antígeno quimérico. En estos ejemplos, cuando dos péptidos están presentes en la misma molécula, el polipéptido quimérico puede comprender una o más regiones de unión a ligando.

La inducción química de la dimerización de proteína (CID) se ha aplicado eficazmente para hacer que el suicidio celular o la apoptosis sea inducible con el ligando de homodimerización de la molécula, rimiducid (AP1903). Esta tecnología subyace al "interruptor de seguridad" incorporado como adjunto a la terapia génica en trasplantes de células (1, 2). El principio central de la tecnología es que las vías regulatorias celulares normales que se basan en la interacción proteína-proteína como parte de una vía de señalización pueden adaptarse para el control condicional dependiente de ligando en caso de que se use un fármaco de dimerización de molécula pequeña para controlar el elemento de oligomerización de proteína-proteína (3-5). La dimerización inducida de una proteína de fusión que comprende Caspasa-9 y FKBP12 o una variante de FKBP12 (es decir, "iCaspasa9/iCasp9/iC9/CaspaCIDa") usando un ligando de homodimerización, tal como rimiducid, AP1510 o AP20187, puede efectuar rápidamente la muerte celular. La Caspasa-9 es una caspasa iniciadora que actúa como "portero" del proceso apoptótico (6). Normalmente, las moléculas proapoptóticas (por ejemplo, citocromo c) liberadas de las mitocondrias de células apoptóticas alteran la conformación de Apaf-1, un armazón de unión a Caspasa-9, lo que da lugar a su oligomerización y a la formación del "apoptosoma". Esta alteración facilita la dimerización de Caspasa-9 y la escisión de su forma latente en una molécula activa que, a su vez, escinde al efector de la apoptosis "aguas abajo", caspasa-3, lo que da lugar a una muerte celular irreversible. Rimiducid se une directamente a dos motivos de FKBP12-V36 y puede dirigir la dimerización de proteínas de fusión que incluyen FKBP12-V36 (1, 2). El acoplamiento de iC9 a rimiducid evita la necesidad de conversión de Apaf1 al apoptosoma activo. En este ejemplo, la fusión de Caspasa-9 a motivos de proteína que se acoplan a un ligando de heterodimerización se evalúa respecto de su capacidad para dirigir su activación y la muerte celular con una eficacia similar a la activación de iC9 mediada por rimiducid.

Se seleccionaron MyD88 y CD40 como base del interruptor de activación de iMC. MyD88 desempeña un papel de señalización central en la detección de patógenos o de lesión celular por las células presentadoras de antígenos (APC), como las células dendríticas (CD). Después de la exposición a moléculas de "peligro" procedentes de células patógenas o necróticas, se activa una subclase de "receptores de reconocimiento de patrones", denominados receptores de tipo Toll (TLR), lo que da lugar a la agregación y activación de la molécula adaptadora, MyD88, mediante los dominios TLR-IL1Ra (TIR) homólogos en ambas proteínas. MyD88, a su vez, activa la señalización aguas abajo, a través del resto de la proteína. Esto da lugar a la regulación positiva de proteínas coestimuladoras, como CD40 y otras proteínas, tales como MHC y proteasas, necesarias para el procesamiento y la presentación de antígenos. La fusión de los dominios de señalización de MyD88 y CD40 con dos dominios Fv, proporciona iMC (también iFvFvMC), que activa potentemente a las CD después de la exposición a rimiducid (7). Después, se

descubrió que iMC es una potente proteína coestimuladora también para linfocitos T.

La rapamicina es un producto natural macrólido que se une con alta afinidad (< 1 nM) a FKBP12 y juntos inician la interacción inhibidora de alta afinidad con el dominio de unión a FKBP-rapamicina (FRB) de mTOR (8). FRB es pequeño (89 aminoácidos) y por lo tanto puede usarse como "marcador" o "asa" de proteína cuando se adjunta a diversas proteínas (9-11). La coexpresión de una proteína fusionada a FRB con una segunda proteína fusionada a FKBP12 hace que su aproximación sea inducible por rapamicina (12-16). Este y los ejemplos siguientes proporcionan experimentos y resultados diseñados para evaluar si la expresión de Caspasa-9 unida a FRB con Caspasa-9 unida a FKBP (iC9) también puede dirigir la apoptosis y servir como base para un interruptor de seguridad celular regulado por el ligando disponible por vía oral, rapamicina o derivados de la rapamicina (rapálogos) que no inhiben a mTOR a una baja dosis terapéutica pero en cambio se unen con dominios seleccionados de FRB mutante fusionados a Caspasa-9.

En esta sección se citan algunas de las siguientes referencias.

1. Straathof KC, Pule MA, Yotnda P, Dotti G, Vanin EF, Brenner MK, Heslop HE, Spencer DM y Rooney CM. An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy. Blood. 2005;105(11):4247-54.
2. Fan L, Freeman KW, Khan T, Pham E y Spencer DM. Improved artificial death switches based on caspases and FADD. Hum Gene Ther. 1999;10(14):2273-85.
3. Spencer DM, Wandless TJ, Schreiber SL y Crabtree GR. Controlling signal transduction with synthetic ligands. Science. 1993;262(5136):1019-24.
4. Acevedo VD, Gangula RD, Freeman KW, Li R, Zhang Y., Wang F, Ayala GE, Peterson LE, Ittmann M y Spencer DM. Inducible FGFR-1 activation leads to irreversible prostate adenocarcinoma and an epithelial-to-mesenchymal transition. Cancer Cell. 2007;12(6):559-71.
5. Spencer DM, Belshaw PJ, Chen L, Ho SN, Randazzo F, Crabtree GR y Schreiber SL. Functional analysis of Fas signaling *in vivo* using synthetic inducers of dimerization. Curr Biol. 1996;6(7):839-47.
6. Strasser A, Cory S y Adams JM. Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. EMBO J. 2011;30(18):3667-83.
7. Narayanan P, Lapteva N, Seethammagari M, Levitt JM, Slawin KM y Spencer DM. A composite MyD88/CD40 switch synergistically activates mouse and human dendritic cells for enhanced antitumor efficacy. J Clin Invest. 2011;121(4):1524-34.
8. Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P y Snyder SH. RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. Cell. 1994;78(1):35-43.
9. Brown EJ, Albers MW, Shin TB, Ichikawa K, Keith CT, Lane WS y Schreiber SL. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. Nature. 1994;369(6483):756-8.
10. Chen J, Zheng XF, Brown EJ y Schreiber SL. Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. Proc Natl Acad Sci USA. 1995;92(11):4947-51.
11. Choi J., Chen J, Schreiber SL y Clardy J. Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. Science. 1996;273(5272):239-42.
12. Ho SN, Biggar SR, Spencer DM, Schreiber SL y Crabtree GR. Dimeric ligands define a role for transcriptional activation domains in reinitiation. Nature. 1996;382(6594):822-6.
13. Klemm JD, Beals CR y Crabtree GR. Rapid targeting of nuclear proteins to the cytoplasm. Curr Biol. 1997;7(9):638-44.
14. Bayle JH, Grimley JS, Stankunas K, Gestwicki JE, Wandless TJ y Crabtree GR. Rapamycin analogs with differential binding specificity permit orthogonal control of protein activity. Chem Biol. 2006;13(1):99-107.
15. Stankunas K, Bayle JH, Gestwicki JE, Lin YM, Wandless TJ y Crabtree GR. Conditional protein alleles using knockin mice and a chemical inducer of dimerization. Mol Cell. 2003;12(6):1615-24.
16. Stankunas K, Bayle JH, Havranek JJ, Wandless TJ, Baker D, Crabtree GR y Gestwicki JE. Rescue of Degradation-Prone Mutants of the FK506-Rapamycin Binding (FRB) Protein with Chemical Ligands. Chembiochem. 2007.

Formulaciones y vías de administración a pacientes

Cuando se contemplan aplicaciones clínicas, será necesario preparar composiciones-construcciones de expresión farmacéuticas, vectores de expresión, proteínas fusionadas, células transfectadas o transducidas, en una forma adecuada para la aplicación prevista. Generalmente, esto implicará preparar composiciones que están sustancialmente libres de pirógenos, así como de otras impurezas que podrían ser perjudiciales para seres humanos o animales.

El ligando multimérico, tal como, por ejemplo, AP1903, puede administrarse, por ejemplo, a dosis de aproximadamente 0,1 a 10 mg/kg de peso del sujeto, de aproximadamente 0,1 a 5 mg/kg de peso del sujeto, de aproximadamente 0,2 a 4 mg/kg de peso del sujeto, de aproximadamente 0,3 a 3 mg/kg de peso del sujeto, de aproximadamente 0,3 a 2 mg/kg de peso del sujeto o de aproximadamente o de aproximadamente 0,3 a 1 mg/kg de peso del sujeto, por ejemplo, aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mg/kg de peso del sujeto. El ligando se proporciona a 0,4 mg/kg por dosis, por ejemplo, a una

concentración de 5 mg/ml. Pueden proporcionarse viales u otros envases que contienen el ligando a, por ejemplo, un volumen por vial de aproximadamente 0,25 ml a aproximadamente 10 ml, por ejemplo, aproximadamente 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 o 10 ml, por ejemplo, aproximadamente 2 ml.
En general puede ser deseable emplear sales y tampones adecuados para hacer que los vectores de suministro sean estables y permitir su captación por células diana. También pueden emplearse tampones cuando se introducen células recombinantes en un paciente. Las composiciones acuosas comprenden una cantidad eficaz del vector para las células, disuelta o dispersa en un vehículo o medio acuoso farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones también se denominan inóculos. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos, y similares. Se conoce el uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con los vectores o células, se contempla su uso en composiciones terapéuticas. Pueden incorporarse principios activos complementarios en las composiciones.

Las composiciones activas pueden incluir preparaciones farmacéuticas clásicas. La administración de estas composiciones puede ser por cualquier vía común, en tanto que el tejido diana esté disponible a través de dicha ruta. Esto incluye, por ejemplo, oral, nasal, bucal, rectal, vaginal o tópica. Como alternativa, la administración puede ser ortóptica, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o inyección intravenosa. Dichas composiciones normalmente se administrarán en forma de composiciones farmacéuticamente aceptables, analizadas en el presente documento.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma es estéril y fluida hasta el punto de que pueden inyectarse fácilmente con una jeringa. Es estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se protege contra la acción contaminante de los microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. Puede lograrse la prevención de la acción de microorganismos mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, acido sórbico, timerosal y similares. En ciertos ejemplos, pueden incluirse agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. Puede lograrse la absorción prolongada de la composición inyectable mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasen la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.
Para administración oral, pueden incorporarse las composiciones con excipientes y usarse en forma de enjuagues bucales y dentífricos no digeribles. Puede prepararse un enjuague bucal incorporando el principio activo en la cantidad necesaria en un disolvente adecuado, tal como una solución de borato de sodio (solución de Dobell). Como alternativa, el principio activo puede incorporarse en un enjuague antiséptico que contiene borato de sodio, glicerina y bicarbonato de potasio. El principio activo también puede dispensarse en dentífricos, incluyendo, por ejemplo: geles, pastas, polvos y suspensiones. El principio activo puede añadirse en una cantidad terapéuticamente eficaz a una pasta dentífrica que puede incluir, por ejemplo, agua, aglutinantes, abrasivos, agentes aromatizantes, agentes espumantes y humectantes.

Las composiciones pueden formularse en una forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico o ácidos orgánicos, tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden obtenerse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio o hidróxidos férricos, y dichas bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

Tras la formulación, las soluciones se administrarán de manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas farmacéuticas tales como soluciones inyectables, cápsulas de liberación de fármaco y similares. Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución puede tamponarse de manera adecuada en caso necesario y el diluyente líquido se hace isotónico con suficiente suero salino o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, pueden usarse medios acuosos estériles. Por ejemplo, puede disolverse una dosis en 1 ml de solución isotónica de NaCl y o bien se añade a 1000 ml de fluido de hipodermoclisis o se inyecta en el sitio de infusión propuesto, (véase, por ejemplo "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15.ª Edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Necesariamente se producirá cierta variación en la dosis dependiendo de la afección del sujeto que se esté tratando. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis adecuada para el hospedador individual. Además, para administración a seres humanos, las preparaciones pueden cumplir estándares de esterilidad, pirogenicidad y seguridad y pureza generales, según se requiere por la Oficina de Patrones Biológicos de la FDA.

Ejemplos

Los ejemplos expuestos a continuación ilustran la tecnología descrita en el presente documento y no limitan dicha tecnología.

Se han estudiado mecanismos para suprimir de manera selectiva las células donantes como interruptores de seguridad para terapias celulares, pero ha habido complicaciones. Las experiencias con genes de interruptor de seguridad hasta la fecha están relacionadas con los linfocitos T, ya que la inmunoterapia con estas células ha demostrado ser eficaz como tratamiento para infecciones víricas y neoplasias malignas (Walter, E.A., et al., N. Engl. J. Med. 1995, 333:1038-44; Rooney, C.M., et al., Blood. 1998, 92:1549-55; Dudley, M. E., et al., Science 2002, 298:850-54; Marjit, W.A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2003, 100:2742-47). Se ha usado el gen de timidina quinasa procedente del virus del herpes simple I (HSVTK) como interruptor de suicidio *in vivo* en infusiones de linfocitos T donantes para tratar neoplasias malignas recurrentes y la linfoproliferación por virus de Epstein Barr (EBV) después del trasplante de células madre hematopoyéticas (Bonini C, et al., Science. 1997, 276:1719-1724; Tiberghien P, et al., Blood. 2001,97:63-72). Sin embargo, la destrucción de los linfocitos T que provocaban la enfermedad de injerto contra hospedador fue incompleta y el uso de ganciclovir (o análogos) como profármaco para activar HSV-TK impide la administración de ganciclovir como fármaco antivírico para infecciones por citomegalovirus. Este mecanismo de acción también requiere la interferencia con la síntesis de ADN, basándose en la división celular, de tal forma que puede prolongarse a lo largo de varios días y ser incompleta, produciendo un prolongado retraso en el beneficio clínico (Ciceri, F., et al., Lancet Oncol. 2009, 262:1019-24). Además, las respuestas inmunitarias dirigidas por HSV-TK han dado como resultado la eliminación de células transducidas por HSV-TK, incluso en pacientes con virus de la inmunodeficiencia humana inmunodeprimidos y con trasplante de médula ósea, lo que compromete la persistencia y por tanto la eficacia de los linfocitos T infundidos. HSV-TK también es de origen vírico y por lo tanto, es potencialmente inmunogénico (Bonini C, et al., Science. 1997, 276:1719-1724; Riddell SR, et al., Nat Med. 1996, 2:216-23). También se ha usado clínicamente el gen de citosina desaminasa procedente de *E. coli* (Freytag SO, et al., Cancer Res. 2002, 62:4968-4976), pero como xenoantígeno, puede ser inmunogénico y por tanto incompatible con las terapias a base de linfocitos T que requieren persistencia a largo plazo. CD20 humano transgénico, que puede activarse por un anticuerpo monoclonal quimérico anti-CD20, se ha propuesto como sistema de seguridad no inmunogénico (Introna M, et al., Hum Gene Ther. 2000, 11: 611-620).

La sección a continuación proporciona ejemplos del método para proporcionar un interruptor de seguridad en células usadas para terapia celular, usando una proteína quimérica de Caspasa-9.

Ejemplo 1: Construcción y evaluación de vectores de expresión del interruptor de suicidio de Caspasa-9

Construcción del vector y confirmación de la expresión

En el presente documento se presenta un interruptor de seguridad que puede expresarse de manera estable y eficiente en linfocitos T humanos. El sistema incluye productos génicos con una baja inmunogenicidad potencial que se han modificado para que interactúen con un fármaco dimerizador de molécula pequeña que es capaz de provocar la eliminación selectiva de linfocitos T transducidos que expresan el gen modificado. Además, la Caspasa-9 inducible mantiene su función en los linfocitos T que sobreexpresan moléculas antiapoptóticas.

Se construyeron vectores de expresión adecuados para su uso como agente terapéutico que incluían una actividad de Caspasa-9 humana modificada fusionada a una proteína de unión a FK506 humana (FKBP), tal como, por ejemplo, FKBP12v36. La actividad híbrida de Caspasa-9/FK506 puede dimerizarse usando un agente farmacéutico de molécula pequeña. Se fusionaron versiones de longitud completa, truncadas y modificadas de la actividad de Caspasa-9 al dominio de unión a ligando o la región de multimerización y se insertaron en el vector retrovírico MSCV.IRES.GRP, que también permite la expresión del marcador fluorescente, GFP. La FIG. 1A ilustra los vectores de expresión de Caspasa-9 de longitud completa, truncados y modificados construidos y evaluados como interruptor de suicidio para la inducción de la apoptosis.

La molécula de Caspasa-9 inducible de longitud completa (F'-F-C-Casp9) incluye 2, 3 o más proteínas de unión a FK506 (FKBPs, por ejemplo, variantes de FKBP12v36) unidas con un enlazador de Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser a la subunidad mayor y menor de la molécula de Caspasa (véase la FIG. 1A). Caspasa-9 inducible de longitud completa (F'F-C-Casp9.1.GFP) tiene una Caspasa-9 de longitud completa, también incluye un dominio de reclutamiento de Caspasa (CARD; GenBank NM001 229) ligado a 2 proteínas de unión a FK506 humanas de 12 kDa (FKBP12; GenBank AH002 818) que contienen una mutación F36V (FIG. 1A). La secuencia de aminoácidos de uno o más de los FKBP (F') se inestabilizó en los codones (por ejemplo, se alteró el 3.er nucleótido de cada codón de aminoácidos mediante una mutación silente que mantenía el aminoácido originalmente codificado) para prevenir la recombinación de homólogos cuando se expresó en un retrovirus. F'F-C-Casp9C3S incluye una mutación de cisteína a serina en la posición 287 que altera su sitio de activación. En las construcciones F'F-Casp9, F-C-Casp9 y F'-Casp9, uno cualquiera de los dominios de activación de Caspasa (CARD), un FKBP o ambos, se eliminaron, respectivamente. Todas las construcciones se clonaron en MSCV.IRES.GFP en forma de fragmentos de EcoRI-XhoI.

Se transfectaron células 293T con cada una de estas construcciones y 48 horas después de la transducción, se

analizó la expresión del gen marcador de GFP mediante citometría de flujo. Además, 24 horas después de la transfección, se incubaron las células 293T durante una noche con CID 100 nM y posteriormente se tiñeron con el marcador de la apoptosis, anexina V. Se muestran la media y la desviación típica del nivel de expresión transgénica (GFP media) y el número de células apoptóticas antes y después de su exposición al inductor químico de la dimerización (CID) (% de anexina V en GFP-células) de 4 experimentos separados, en las columnas segunda a quina de la tabla en la FIG. 1A. Además del nivel de expresión de GFP y de tinción para anexina V, también se analizaron los productos génicos expresados de Caspasa-9 de longitud completa, truncada y modificada mediante Western blot para confirmar que los genes de Caspasa-9 se expresaban y que el producto expresado tenía el tamaño esperado. Los resultados del Western blot se presentan en la FIG. 1B.

La coexpresión de las construcciones de Caspasa-9 inducible del tamaño esperado con el gen marcador GFP en células 293T transfectadas se demostró mediante Western blot usando un anticuerpo para Caspasa-9 específico para los residuos de aminoácido 299-318, ambos presentes en las moléculas de Caspasa de longitud completa y truncadas, así como un anticuerpo específico para GFP. Los Western blot se llevaron a cabo como se presenta en el presente documento.

Se resuspendieron células 293T transfectadas en tampón de lisis (Tris/Gly al 50 %, dodecilsulfato de sodio al 10 % [SDS], beta-mercaptoetanol al 4 %, glicerol al 10 %, agua al 12 %, 4 % de azul de bromofenol al 0,5 %) que contenía aprotinina, leupeptina y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (Boehringer, Ingelheim, Alemania) y se incubaron durante 30 minutos sobre hielo. Después de una centrifugación de 30 minutos, se recogió el sobrenadante; se mezcló a 1:2 con tampón de Laemmli (Bio-Rad, Hercules, CA), se hirvió y se cargó en un gel de SDS-poliacrilamida al 10 %. La membrana se sondó con inmunoglobulina G de conejo anti-Caspasa-9 (residuos de aminoácido 299-318) (IgG; Affinity BioReagents, Golden, CO; dilución 1:500) y con IgG de ratón anti-GFP (Covance, Berkeley, CA; dilución 1:25.000). Después, se expusieron las transferencias a anticuerpos secundarios adecuados acoplados a peroxidasa y se detectó la expresión de proteína con quimioluminiscencia potenciada (ECL; Amersham, Arlington Heights, IL). Después, se desmontó la membrana y se volvió a sondar con anticuerpo policlonal de cabra anti-actina (Santa Cruz Biotechnology; dilución 1:500) para comprobar la igualdad de la carga.

Las bandas de menor tamaño adicionales, parecen probablemente representar, en la FIG. 1B, productos de degradación. Los productos de degradación para las construcciones de F'F-C-Casp9 y F'F-Casp9 pueden no detectarse debido a un menor nivel de expresión de estas construcciones como resultado de su actividad basal. Se confirmó la igualdad de carga de cada muestra por las cantidades sustancialmente iguales de actina mostradas en la parte inferior de cada carril del Western blot, lo que indica que en cada carril se cargaron cantidades sustancialmente similares de proteína.

En el presente documento se proporciona un ejemplo de un polipéptido quimérico que puede expresarse en las células modificadas. En este ejemplo, se codifica un solo polipéptido por el vector de ácido nucleico. El polipéptido de Caspasa-9 inducible se separa del polipéptido de CAR durante la traducción, debido al salto de un enlace peptídico. (Donnelly, ML 2001, J. Gen. Virol. 82:1013-25).

Evaluación de las construcciones de expresión del interruptor de suicidio de Caspasa-9.

Líneas celulares

Las líneas de linfocitos B transformadas B 95-8 EBV (LCL), Jurkat y células MT-2 (amablemente proporcionadas por el Dr S. Marriott, Baylor College of Medicine, Houston, TX) se cultivaron en RPMI 1640 (Hyclone, Logan, UT) que contenía suero bovino fetal al 10 % (FBS; Hyclone). Las líneas de linfocitos T específicas para EBV policlonales se cultivaron en RPMI al 45 %/Clicks al 45 % (Irvine Scientific, Santa Ana, CA)/FBS al 10 % y se generaron como se ha comunicado anteriormente. En resumen, se estimularon células mononucleares de sangre periférica (2 x 10^6 por pocillo de una placa de 24 pocillos) con LCL autólogas irradiadas a 4000 rad a una relación de respondedor a estimulador (R/S) de 40:1. Después de 9 a 12 días, se estimularon las células viables con LCL irradiadas a una relación de R/S de 4:1. Posteriormente, se expandieron linfocitos T citotóxicos (CTL) mediante reestimulación semanal con LCL en presencia de 40 U/ml a 100 U/ml de interleucina-2 humana recombinante (rhIL-2; Proleukin; Chiron, Emeryville, CA).

Transducción de retrovirus

Para la producción transitoria de retrovirus, se transfectaron células 293T con construcciones de iCasp9/iFas, junto con plásmidos que codifican gag-pol y envuelta de RD 114 usando el reactivo de transfección GeneJuice (Novagen, Madison, WI). El virus se recogió 48 a 72 horas después de la transfección, se congeló inmediatamente y se almacenó a -80 °C hasta su uso. Se generó una línea productora derivada por retrovirus de FLYRD 18 mediante múltiples transducciones con sobrenadante retrovírico transitorio seudotipado de VSV-G. Se clasificaron en células individuales las células FLYRD18 con la expresión de transgén más elevada y el clon que produjo el máximo título de virus se expandió y usó para producir virus para la transducción de linfocitos. La expresión transgénica, la función y el título retrovírico de este clon se mantuvo durante el cultivo continuo durante más de 8 semanas. Para la transducción de linfocitos humanos, se recubrió una placa de 24 pocillos no tratada para cultivo tisular (Becton

Dickinson, San Jose, CA) con fragmento de fibronectina recombinante (FN CH-296; Retronectina; Takara Shuzo, Otsu, Japón; 4 µg/ml en PBS, durante una noche a 4 °C) y se incubó dos veces con 0,5 ml de retrovirus por pocillo durante 30 minutos a 37 °C. Posteriormente, se transdujeron de 3 x10^5 a 5 x 10^5 linfocitos T por pocillo durante 48 a 72 horas usando 1 ml de virus por pocillo en presencia de 100 U/ml de IL-2. La eficacia de la transducción se determinó mediante el análisis de la expresión del gen marcador coexpresado de proteína fluorescente verde (GFP) en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson). Para estudios funcionales, las CTL transducidas o no se seleccionaron o se segregaron en poblaciones con baja, intermedia o alta expresión de GFP usando un citómetro MoFlo (Dako Cytomation, Ft Collins, CO) del modo indicado.

Inducción y análisis de la apoptosis

Se añadió CID (AP20187; ARIAD Pharmaceuticals) a las concentraciones indicadas a células 293T transfectadas o a CTL transducidas. Las células adherentes y no adherentes se recuperaron y lavaron con tampón de unión a anexina (BD Pharmingen, San Jose, CA). Las células se tiñeron con anexina-V y 7-amino-actinomicina D (7-AAD) durante 15 minutos de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BD Pharmingen). Transcurrida 1 hora después de la tinción, se analizaron las células mediante citometría de flujo usando el programa informático CellQuest (Becton Dickinson).

Ensayo de citotoxicidad

Se evaluó la actividad citotóxica de cada línea de CTL en un ensayo convencional de 4 h de liberación de ^{51}Cr, como se ha presentado previamente. Las células diana incluyeron LCL autólogas, LCL desemparejadas para el antígeno de leucocitos humanos (HLA) de clase I y la línea celular de linfoma de linfocitos T sensible a linfocitos citolíticos naturales activados por linfoquinas HSB-2. Las células incubadas en medio completo o Triton X-100 al 1 % (Sigma, St Louis, MO) se usaron para determinar la liberación espontánea y máxima de ^{51}Cr, respectivamente. Se calculó el porcentaje medio de lisis específica de pocillos triplicados como 100 X (liberación experimental - liberación espontánea) / (liberación máxima - liberación espontánea).

Fenotipado

Se investigó el fenotipo de la superficie celular usando los siguientes anticuerpos monoclonales: CD3, CD4, CD8 (Becton Dickinson) y CD56 y TCR-α/β (Immunotech, Miami, FL). Se detectó ΔNGFR-iFas usando anticuerpo anti-NGFR (Chromaprobe, Aptos, CA). En cada experimento se usaron controles de isotipo emparejados adecuados (Becton Dickinson). Las células se analizaron con un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson).

Análisis de la producción de citoquinas

La concentración de interferón-γ (IFN-γ), IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 y factor de necrosis tumoral-α (TNFα) en los sobrenadantes de cultivo de CTL se midió usando la matriz de perlas citométricas para citoquinas de Th1/Th2 humanas (BD Pharmingen) y se midió la concentración de IL-12 en los sobrenadantes de cultivo mediante ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA; R&D Systems, Minneapolis, MN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Experimentos in vivo

Se irradió a ratones con inmunodeficiencia severa combinada diabéticos no obesos (NOD/SCID) de 6 a 8 semanas de edad (250 rad) y se les inyectó por vía subcutánea en el flanco izquierdo de 10 x 10^6 a 15 x 10^6 LCL resuspendidas en Matrigel (BD Bioscience). Dos semanas después, se inyectó a los ratones portaban tumores que eran de aproximadamente 0,5 cm de diámetro a través de la vena caudal una mezcla 1:1 de EBV CTL no traducidas y transducidas con iCasp9.I.GFPhigh (total de 15 x 10^6). A las 4 a 6 horas antes y 3 días después de la infusión de las CTL, se inyectó a los ratones hIL-2 recombinante por vía intraperitoneal (2000 U; Proleukin; Chiron). En el día 4, se segregó aleatoriamente a los ratones en 2 grupos: 1 grupo recibió CID (50 µg, AP20187, por vía intraperitoneal) y 1 grupo recibió solo vehículo (propanodiol al 16,7 %, PEG400 al 22,5 % y Tween 80 al 1,25 %, por vía intraperitoneal). En el día 7, se sacrificó a todos los ratones. Se homogeneizaron los tumores y se tiñeron con anti-CD3 humano (BD Pharmingen). Mediante análisis FACS, se evaluó el número de células GFP+ en la población clasificada para $CD3^+$. Se usaron tumores de un grupo de ratones de control que recibieron únicamente CTL no transducidas (total de 15 x 10^6) como control negativo en el análisis de las células $CD3^+$/GFP^+.

Optimización de la expresión y función de Caspasa-9 inducible

Se evaluó la idoneidad de las caspasas 3, 7 y 9 como moléculas de interruptor de seguridad inducible tanto en células 293T transfectadas como en linfocitos T humanos transducidos. Solo la Caspasa-9 inducible (iCasp9) se expresó a niveles suficientes para conferir sensibilidad al CID elegido (por ejemplo, inductor químico de la dimerización). Una exploración inicial indicó que iCasp9 de longitud completa no se podía mantener estable a altos niveles en linfocitos T, posiblemente debido a que las células transducidas se eliminan por la actividad basal del transgén. El dominio CARD está implicado en la dimerización fisiológica de las moléculas de Caspasa-9, por una

interacción impulsada por citocromo C y adenosina trifosfato (ATP) con el factor de activación de proteasa apoptótica 1 (Apaf-1). Debido al uso de un CID para inducir la dimerización y la activación del interruptor de suicidio, la función del dominio CARD es superflua en este contexto y se investigó la eliminación del dominio CARD como método para reducir la actividad basal. Dado que solo se necesita dimerización en lugar de multimerización para la activación de Caspasa-9, también se investigó un solo dominio FKBP12v36 como un método para la activación eficaz.

Se comparó la actividad de las formas truncadas y/o modificadas resultantes de Caspasa-9 (por ejemplo, se eliminan el dominio CARD o uno de los 2 dominios FKBP o ambos). Una construcción con un sitio de activación alterado, F'F-C-Casp9$_{C\text{-}>S}$, proporcionó un control no funcional (véase la FIG. 1A). Todas las construcciones se clonaron en el vector retrovírico MSCV[26], en el que las repeticiones terminales largas retrovíricas (LTR) dirigen la expresión del transgén y se coexpresa GFP potenciada a partir del mismo ARNm mediante el uso de un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES). En células 293T transfectadas, se demostró mediante Western blot la expresión de todas las construcciones de Caspasa-9 con el tamaño esperado, así como la coexpresión de GFP (véase la FIG. 1B). La expresión de proteína (estimada mediante la fluorescencia media de GFP y visualizada en el Western blot) fue máxima en la construcción no funcional F'F-C-Casp9$_{C\text{-}>S}$ y se redujo en gran medida en la construcción F'F-C-Casp9C. La eliminación de CARD (F'F-Casp9), un FKBP (F-C-Casp9) o ambos (F-Casp9) dio como resultado una expresión progresivamente mayor tanto de Caspasa-9 inducible como de GFP y por consiguiente, potenció la sensibilidad a CID (véase la FIG. 1A). Basándose en estos resultados, se usó la construcción F-Casp9 (en lo sucesivo citada como iCasp9$_M$) para su estudio posterior en linfocitos T humanos.

Expresión estable de iCasp9$_M$ en linfocitos T humanos

La estabilidad a largo plazo de la expresión del gen de suicidio es de la máxima importancia, ya que los genes de suicidio han de expresarse durante todo el tiempo que persistan las células modificadas por ingeniería genética. Para la transducción de linfocitos T, se generó un clon productor retrovírico procedente de FLYRD18 que produce altos títulos de virus seudotipado RD114 para facilitar la transducción de linfocitos T. Se evaluó la expresión de iCasp9$_M$ en líneas de CTL específicas para EBV (EBV-CTL) ya que las CTL específicas para EBV tienen una función y especificidad bien caracterizadas y ya se están usando como terapia *in vivo* para la prevención y el tratamiento de neoplasias malignas asociadas con EBV. Se obtuvieron eficacias de transducción consistentes de las EBV-CTL de más del 70 % (media, 75,3 %; intervalo, 71,4 %-83,0 % en 5 donantes diferentes) después de una sola transducción con retrovirus. La expresión de iCasp9$_M$ en las EBV-CTL fue estable durante al menos 4 semanas después de la transducción sin selección o pérdida de la función del transgén.

iCasp9$_M$ no altera las características de linfocitos T transducidos

Para asegurarse de que la expresión de iCasp9$_M$ no alteraba las características de linfocitos T, se compararon el fenotipo, la especificidad de antígeno, el potencial proliferativo y la función de las EBV-CTL no transducidas o no funcionales transducidas con iCasp9$_{C\text{-}>S}$ con la de las EBV-CTL transducidas con iCasp9$_M$. En 4 donantes separados, las CTL transducidas y no transducidas consistían en números iguales de células CD4$^+$, CD8$^+$, CD56$^+$ y TCR α/β+. De manera similar, la producción de citoquinas que incluían IFN-γ, TNFα, IL-10, IL-4, IL-5 e IL-2 no se vio alterada por la expresión de iCasp9$_M$. Las EBV-CTL transducidas con iCasp9$_M$ lisaron de manera específica LCL autólogas de manera comparable a las CTL no transducidas y transducidas de control. La expresión de iCasp9M no afectó a las características de crecimiento de las CTL en crecimiento exponencial y de manera importante, se conservó la dependencia del antígeno y de IL-2 para la proliferación. En el día 21 después de la transducción, se continuó o interrumpió la estimulación antigénica semanal normal con LCL autólogos e IL-2. La interrupción de la estimulación con antígeno dio como resultado una reducción sostenida de linfocitos T.

Eliminación de más de un 99 % *de los linfocitos T seleccionados para alta expresión del transgén in vitro*

Se evaluó la eficacia de iCasp9$_M$ inducible en las CTL monitorizando la pérdida de células que expresan GFP después de la administración de CID; se eliminó un 91,3 % (intervalo, 89,5 %-92,6 % en 5 donantes diferentes) de las células GFP$^+$ después de una sola dosis de CID 10 nM. Se obtuvieron resultados similares independientemente del tiempo de exposición a CID (intervalo, 1 hora-continua). En todos los experimentos, las CTL que sobrevivieron al tratamiento con CID tenían baja expresión del transgén, con una reducción del 70 % (intervalo, 55 %-82 %) en la intensidad media de fluorescencia de GFP después de CID. No pudo obtenerse una eliminación adicional de los linfocitos T GFP$^+$ supervivientes mediante estimulación con antígeno seguida de una segunda dosis de CID 10 nM. Por lo tanto, lo más probable es que los CTL sin respuesta expresaron una cantidad insuficiente de iCasp9$_M$ para su activación funcional mediante CID. Para investigar la correlación entre los bajos niveles de expresión y la ausencia de respuesta de las CTL a CID, Se clasificaron las CTL según su expresión baja, intermedia y elevada del gen marcador GFP ligado y se mezclaron 1:1 con CTL no transducidos del mismo donante para permitir una cuantificación precisa del número de linfocitos T transducidos que responden a la apoptosis inducida por CID.

El número de linfocitos T transducidos eliminados aumentó con el nivel de expresión de transgén de GFP (véanse las FIG. 4A, 4B y 4C). Para determinar la correlación entre la expresión del transgén y la función de iCasp9$_M$, se seleccionaron EBV-CTL transducidas con iCasp9$_M$ IRES.GFP respecto de su baja (media 21), intermedia (media 80) y alta (media 189) expresión de GFP. Los linfocitos T seleccionados se incubaron durante una noche con CID 10 nM

y posteriormente se tiñeron con anexina V y 7-AAD. Se indican los porcentajes de anexina V^+/7-AAD- y anexina V^+/7-AAD^+ T-. Los linfocitos T seleccionados se mezclaron 1:1 con linfocitos T no transducidos y se incubaron con CID 10 nM después de la estimulación con antígeno. Se indica el porcentaje de linfocitos T positivos a GFP residuales en el día 7.

Para células seleccionadas para GFP_{alta}, CID 10 nM dio lugar a la eliminación de un 99,1 % (intervalo, 98,7 %-99,4 %) de las células transducidas. En el día de la estimulación con antígeno, las CTL transducidas con F-$Casp9_M$.I.GFP o no se trataron o se trataron con CID 10 nM. Siete días después, se midió la respuesta a CID mediante citometría de flujo para GFP. El porcentaje de linfocitos T transducidos se ajustó al 50 % para permitir una medición precisa de las células GFP^+ residuales después del tratamiento con CID. Se compararon las respuestas a CID en CTL no seleccionadas (fila superior) y seleccionadas para GFP_{alta} (fila inferior). Se indica el porcentaje de células GFP+ residuales.

La rápida inducción de la apoptosis en las células seleccionadas para GFP_{alta} se demuestra por las características apoptóticas, tales como encogimiento celular y fragmentación a las 14 horas de la administración de CID. Tras la incubación durante una noche con CID 10 nM, los linfocitos T transducidos con F-$Casp9_M$.I.GFP_{alta} tenían características apoptóticas, tales como encogimiento celular y fragmentación según la evaluación microscópica. De los linfocitos T seleccionados para alta expresión, un 64 % (intervalo, 59 %-69 %) tenían un fenotipo apoptótico (anexina-V^++/7-AAD^-) y un 30 % (intervalo, 26 %-32 %) tenía uno necrótico (anexina V^+/7-AAD^+). La tinción con marcadores de la apoptosis mostró que el 64 % de los linfocitos T tenía un fenotipo apoptótico (anexina V^+, 7-AAD^-, cuadrante inferior derecho) y un 32 % un fenotipo necrótico (anexina V^+, 7-AAD^+, cuadrante superior derecho). Se muestra un ejemplo representativo de 3 experimentos separados.
Por el contrario, la inducción de la apoptosis fue significativamente menor en los linfocitos T seleccionados para la expresión intermedia o baja de GFP (véanse las FIG. 4A, 4B y 4C). Por lo tanto, para aplicaciones clínicas, pueden ser deseables versiones de las construcciones de expresión con marcadores de selección que permiten la selección para alto número de copias, altos niveles de expresión o tanto alto número de copias y altos niveles de expresión. La apoptosis inducida por CID se inhibió mediante el inhibidor panCaspasa zVAD-fmk (100 µM) durante 1 hora antes de añadir CID. La titulación de CID mostró que CID 1 nM era suficiente para obtener el efecto de eliminación máximo. Una curva de respuesta a la dosis usando las cantidades indicadas de CID (AP20187) muestra la sensibilidad de F-$Casp9_M$.I.GFP_{alta} a CID. La supervivencia de células GFP^+ se mide en el día 7 después de la administración de la cantidad indicada de CID. Se proporcionan la media y la desviación típica para cada punto. Se obtuvieron resultados similares usando otro inductor químico de la dimerización (CID), AP1903, que se había demostrado clínicamente que tenía sustancialmente ausencia de efectos adversos cuando se administra a voluntarios sanos. La respuesta a la dosis permaneció sin cambios durante al menos 4 semanas después de la transducción.

$iCasp9_M$ es funcional en células malignas que expresan moléculas antiapoptóticas

Se seleccionó Caspasa-9 como molécula proapoptótica inducible para uso clínico en lugar de iFas e iFADD previamente presentados, debido a que Caspasa-9 actúa relativamente tarde en la señalización de la apoptosis y por tanto, se espera que sea menos susceptible a la inhibición por inhibidores de la apoptosis. Por lo tanto, ha de conservarse la función de suicidio no solo en las líneas de linfocitos T transformados malignos que expresan moléculas antiapoptóticas, sino también en subpoblaciones de linfocitos T normales que expresan cantidades elevadas de moléculas antiapoptóticas como parte del proceso para asegurar la preservación a largo plazo de las células de memoria. Para investigar adicionalmente la hipótesis, en primer lugar se comparó la función de $iCasp9_M$ e iFas en EBV-CTL. Para eliminar cualquier potencial diferencia basada en el vector, también se expresó Fas en el vector MSCV.IRES.GFP, como en iCasp9. Para estos experimentos se clasificaron las CTL transducidas tanto con ΔNGFR.iFas.I.GFP como con $iCasp9_M$.I.GFP respecto de la expresión de GFP_{alta} y se mezclaron con CTL no transducidas a una relación 1:1 para obtener poblaciones celulares que expresaban iFas o $iCasp9_M$ en proporciones iguales y a niveles similares. Las EBV-CTL se clasificaron por la alta expresión de GFP y se mezclaron 1:1 con CTL no transducidas, del modo presentado. Se indican los porcentajes de linfocitos T ΔNGFR^+/GFP^+ y GFP^+.

La eliminación de células GFP^+ después de la administración de CID 10 nM fue más rápida y más eficaz en CTL transducidas con $iCasp9_M$ que con iFas (99,2 % +/- 0,14 % de células transducidas con $iCasp9_M$ en comparación con un 89,3 % +/- 4,9 % de células transducidas con iFas en el día 7 después de CID; $P < 0,05$). En el día de la estimulación con LCL, se administró CID 10 nM y se midió GFP en los puntos de tiempo indicados para determinar la respuesta a CID. Los rombos negros representan datos para ΔNGFR-iFas.I.GFP; los cuadrados negros representan datos para $iCasp9_M$.I.GFP. Se muestra la media y la desviación típica de 3 experimentos. También se comparó la función de iCasp9M e iFas en 2 líneas de linfocitos T malignos: Jurkat, una línea de leucemia de linfocitos T sensible a la apoptosis y MT-2, una línea de linfocitos T resistente a la apoptosis, debido a la expresión de c-FLIP y bcl-xL. Se transdujeron células Jurkat y células MT-2 con iFas e $iCasp9_M$ con eficacias similares (92 % frente al 84 % en Jurkat, 76 % frente al 70 % en MT-2) y se cultivaron en presencia de CID 10 nM durante 8 horas. La tinción con anexina-V mostró que aunque iFas e $iCasp9_M$ inducían apoptosis en un número equivalente de células Jurkat (56,4 % +/- 15,6 % y 57,2 % +/-18,9 %, respectivamente), solo la activación de $iCasp9_M$ dio como resultado la apoptosis de células MT-2 (19,3 % +/- 8,4 % y 57,9 % +/- 11,9 % para iFas e $iCasp9_M$, respectivamente; véase la Figura 5C).

Se transdujeron las líneas de linfocitos T humanos Jurkat (a la izquierda) y MT-2 (a la derecha) con ΔNGFR-iFas.I.GFP o iCasp9$_M$.I.GFP. Se transdujo un porcentaje igual de linfocitos T con cada uno de los genes de suicidio: 92 % para ΔNGFR-iFas.I.GFP frente a 84 % para iCasp9$_M$.I.GFP en Jurkat y 76 % para ΔNGFR-iFas.I.GFP frente a 70 % para iCasp9$_M$.I.GFP en MT-2. Los linfocitos T o bien se dejaron sin tratar o se incubaron con CID 10 nM. Ocho horas después de la exposición a CID, se midió la apoptosis tiñendo para anexina V y 7-AAD. Se muestra un ejemplo representativo de 3 experimentos. PE indica ficoeritrina. Estos resultados demuestran que en linfocitos T que sobreexpresan moléculas inhibidoras de la apoptosis, puede bloquearse la función de iFas, mientras que iCasp9$_M$ puede seguir induciendo la apoptosis de manera eficaz.

Eliminación mediada por iCasp9M de linfocitos T que expresan un transgén inmunomodulador

Para determinar si iCasp9M puede destruir eficazmente células modificadas genéticamente para expresar un producto transgénico activo, se midió la capacidad de iCasp9$_M$ para eliminar a EBV-CTL que expresan IL-12 de manera estable. Aunque la IL-12 era indetectable en el sobrenadante de las CTL no transducidas y transducidas con iCasp9$_M$.IRES.GFP, el sobrenadante de las células transducidas con iCasp9$_M$.IRES.IL-12 contenía de 324 pg/ml a 762 pg/ml de IL-12. Después de la administración de CID 10 nM, sin embargo, la IL-12 en el sobrenadante se redujo a niveles indetectables (< 7,8 pg/ml). Por lo tanto, incluso sin clasificación previa para células con elevada expresión del transgén, la activación de iCasp9$_M$ es suficiente para eliminar completamente todos los linfocitos T productores de niveles relevantes de IL-12. El gen marcador de GFP en las construcciones de iCasp9$_M$.I.GFP se reemplazó por flexi IL-12, que codifica las subunidades p40 y p35 de IL-12 humana. Las EBV-CTL transducidas con iCasp9$_M$.I.GFP e iCasp9$_M$.I.IL-12 se estimularon con LCL y después se dejaron sin tratar o se expusieron a CID 10 nM. Tres días después de la segunda estimulación antigénica, se midieron los niveles de IL-12 en el sobrenadante de cultivo mediante ELISA para IL-12 (el límite de detección de este ensayo es de 7,8 pg/ml). Se indican la media y la desviación típica de pocillos por triplicado. Se muestran los resultados de 1 de 2 experimentos con CTL de 2 donantes diferentes.

Eliminación de más de un 99 % *de los linfocitos T seleccionados para alta expresión del transgén in vivo*

También se evaluó la función de iCasp9$_M$ en EBV-CTL transducidas *in vivo*. Se usó un modelo de xenoinjerto humano en ratón SCID para la inmunoterapia adoptiva. Después de la infusión intravenosa de una mezcla 1:1 de CTL no transducidas y transducidas con iCasp9$_M$.IRES.GFP$_{alta}$ en ratones SCID que portaban un xenoinjerto de LCL autólogos, se trató a los ratones o bien con una sola dosis de CID o solo con vehículo. Tres días después de la administración de CID/vehículo, se analizaron los tumores respecto de células CD3$^+$/GFP$^+$ humanas. La detección del componente no transducido del producto de infusión, usando anticuerpos humanos anti-CD3, confirmó el éxito de la infusión en la vena caudal en ratones que recibieron CID.
En ratones tratados con CID, hubo una reducción de más del 99 % en el número de linfocitos T CD3$^+$/GFP$^+$, en comparación con ratones a los que se trató con infusión de solo vehículo, lo que demuestra la sensibilidad igualmente elevada de los linfocitos T transducidos con iCasp9$_M$ *in vivo* e *in vitro*.

Se ensayó la función de iCasp9$_M$ *in vivo*. Se irradió a ratones NOD/SCID y se les inyectó por vía subcutánea de 10 x 10^6 a 15 x 10^6 LCL. Después de 14 días, los ratones portadores de tumores con un diámetro de 0,5 cm recibieron un total de 15 x10^6 EBV-CTL (un 50 % de estas células no estaban transducidas y un 50 % estaban transducidas con iCasp9$_M$.I.GFP y se habían clasificado para alta expresión de GFP). En el día 3 después de la administración de CTL, los ratones recibieron o CID (50 µg de AP20187; (rombos negros, n=6)) o solo vehículo (cuadrados negros, n=5) y en el día 6 se analizó la presencia de linfocitos T CD3$^+$/GFP$^+$ humanos. Se usaron linfocitos T CD3$^+$ humanos aislados de los tumores de un grupo de ratones de control que recibió únicamente CTL no transducidas (15x10^6 CTL; n= 4) como control negativo para el análisis de linfocitos T CD3$^+$/GFP$^+$ en los tumores.

Discusión

En el presente documento se presentan, entre otras cosas, vectores de expresión que expresan genes de suicidio adecuados para eliminar linfocitos T modificados genéticamente in vivo. Los vectores de expresión de gen de suicidio presentados en el presente documento tienen ciertas características ventajosas no limitantes, incluyendo coexpresión estable en todas las células que portan el gen de modificación, expresión a niveles lo suficientemente elevados para provocar muerte celular, baja actividad basal, alta actividad específica y susceptibilidad mínima a las moléculas antiapoptóticas endógenas. En el presente documento se presenta, entre otras cosas, una Caspasa-9 inducible, iCasp9$_M$, que tiene baja actividad basal, lo que permite una expresión estable durante más de 4 semanas en linfocitos T humanos. Una sola dosis de 10 nM de un inductor químico de la dimerización (CID) de molécula pequeña es suficiente para eliminar a más de un 99 % de las células transducidas con iCasp9$_M$ seleccionadas para alta expresión del transgén *in vitro* e *in vivo*. Además, cuando se coexpresa con la citoquina de Th1, IL-12, la activación de iCasp9$_M$ eliminó a todas las células productoras de IL-12 detectables, incluso sin selección para alta expresión del transgén. La Caspasa-9 actúa aguas debajo de la mayoría de moléculas antiapoptóticas, por lo tanto, se conserva una alta sensibilidad a CID independientemente de la presencia de niveles aumentados de moléculas antiapoptóticas de la familia de bcl-2. Por lo tanto, iCasp9$_M$ también puede resultar útil para inducir la destrucción incluso de linfocitos T transformados y de linfocitos T de memoria que son relativamente resistentes a la apoptosis.

A diferencia de otras moléculas de Caspasa, la proteólisis no parece ser suficiente para la activación de Caspasa-9. Los datos cristalográficos y funcionales indican que la dimerización de monómeros inactivos de Caspasa-9 da lugar a la activación inducida por un cambio conformacional. La concentración de pro-Caspasa-9, en un contexto fisiológico, se encuentra en el intervalo de aproximadamente 20 nM, muy por debajo del umbral necesario para la dimerización.

Sin quedar ligado a teoría alguna, se cree que la barrera energética para la dimerización puede superarse por interacciones homofílicas entre los dominios CARD de Apaf-1 y Caspasa-9, impulsada por citocromo C y ATP. La sobreexpresión de Caspasa-9 unida a 2 FKBP puede permitir que se produzca la dimerización espontánea y puede ser responsable de la toxicidad observada en la construcción inicial de Caspasa-9 de longitud completa. Se observó una reducción en la toxicidad y un aumento en la expresión génica después de la eliminación de un FKBP, lo más probablemente a causa de una reducción en la toxicidad asociada con la dimerización espontánea. Aunque la dimerización normalmente está implicada en la activación de receptores de muerte de la superficie, la dimerización de Caspasa-9 debe ser suficiente para mediar la activación. Los datos presentados en el presente documento indican que las construcciones de iCasp9 con un solo FKBP funcionan de un modo igual de eficaz que aquellas con 2 FKBP. El aumento de la sensibilidad a CID mediante la eliminación del dominio CAR puede representar una reducción en el umbral energético de dimerización tras la unión de CID.

La persistencia y la función de genes letales de origen vírico o bacteriano, tales como HSV-TK y citosina desaminasa, puede verse impedido por respuestas inmunitarias no deseadas contra células que expresan los genes letales de origen vírico o bacteriano. Los FKBP y las moléculas proapoptóticas que forman los componentes de $iCasp9_M$ son moléculas de origen humano y por lo tanto, tienen menos probabilidades de inducir una respuesta inmunitaria. Aunque el enlazador entre FKBP y Caspasa-9 y la mutación puntual individual en el dominio FKBP introducen nuevas secuencias de aminoácidos, las secuencias no fueron reconocidas inmunológicamente por los macacos receptores de linfocitos T transducidos con iFas. Además, debido a que los componentes de $iCasp9_M$ son moléculas de origen humano, no debería haber presencia en un receptor de linfocitos T de memoria específicos para las secuencias de unión, a diferencia de las proteínas de origen vírico, tales como HSV-TK, reduciendo de este modo el riesgo de eliminación mediada por una respuesta inmunitaria de linfocitos T transducidos con $iCasp9_M$.

Estudios previos usando Fas inducible o los dominios efectores de muerte (DED) de proteínas de dominio de muerte asociadas con FAS (FAAD) demostraron que aproximadamente un 10 % de las células transducidas eran insensibles a la activación del gen destructivo. Como se observa en los experimentos presentados en el presente documento, una posible explicación para la insensibilidad a CID es la baja expresión del transgén. Los linfocitos T transducidos con $iCasp9_M$ en el presente estudio y los linfocitos T transducidos con iFas de otros que sobrevivieron tras la administración de CID tenían bajos niveles de expresión del transgén. Con la intención de superar un "efecto posicional" retrovírico percibido, se lograron niveles aumentados de expresión homogénea del transgén flanqueando los integrantes retrovíricos con el aislador de cromatina de beta-globina de pollo. La adición del aislador de cromatina aumentó drásticamente la homogeneidad de la expresión en células 293T transducidas, pero no tuvo un efecto significativo en los linfocitos T primarios transducidos. La selección de linfocitos T con altos niveles de expresión minimizó la variabilidad de la respuesta al dimerizador. Más de un 99 % de los linfocitos T transducidos clasificados para alta expresión de GFP se eliminaron tras una sola dosis de CID 10 M. Esta demostración respalda la hipótesis de que las células que expresan altos niveles de gen de suicidio pueden aislarse usando un marcador de selección.

Un número muy pequeño de células residuales resistentes puede provocar la reaparición de la toxicidad, una eficacia de eliminación de hasta 2 log reducirá significativamente esta posibilidad. Para uso clínico, la expresión con un marcador de selección no inmunogénico, tal como NGFR humano truncado, CD20 o CD34 (por ejemplo, en lugar de GFP) posibilitará la selección de linfocitos T con alta expresión de transgén. La coexpresión del interruptor de suicido (por ejemplo, $iCASP9_M$) y un marcador de selección adecuado (por ejemplo, NGFR humano truncado, CD20, CD34, similares y combinaciones de los mismos) puede obtenerse usando o un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) o la modificación postraduccional de una proteína de fusión que contiene una secuencia de autoescisión (por ejemplo, 2A). Por el contrario, en situaciones en las que la única preocupación de seguridad es la toxicidad mediada por el transgén (por ejemplo, receptores de linfocitos T artificiales, citoquinas, similares o combinaciones de los mismos), puede no ser necesaria esta etapa de selección, ya que la estrecha unión entre $iCasp9_M$ y la expresión del transgén permite la eliminación de sustancialmente todas las células que expresan niveles biológicamente relevantes del transgén terapéutico. Esto se demostró coexpresando $iCasp9_M$ con IL-12. La activación de $iCasp9_M$ eliminó sustancialmente cualquier producción medible de IL-12. El éxito de la expresión del transgén y la posterior activación del "interruptor de suicidio" puede depender de la función y la actividad del transgén.

Otra posible explicación para la falta de sensibilidad a CID es que los altos niveles de los inhibidores de la apoptosis pueden atenuar la apoptosis mediada por CID. Los ejemplos de inhibidores de la apoptosis incluyen c-FLIP, miembros de la familia de bcl-2 y proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP), que normalmente regulan el equilibrio entre la apoptosis y la supervivencia. Por ejemplo, la regulación positiva de c-FLIP y bcl-2 hacen que una subpoblación de linfocitos T, destinada a establecer el grupo de memoria, sea resistente a la muerte celular inducida por activación en respuesta a la diana afín o las células presentadoras de antígeno. En varios tumores de linfocitos T, el equilibrio fisiológico entre la apoptosis y la supervivencia se altera en favor de la supervivencia celular. Un gen

de suicidio ha de eliminar sustancialmente todos los linfocitos T transducidos, incluyendo las células de memoria y las transformadas de manera maligna. Por lo tanto, el gen de suicidio inducible seleccionado ha de conservar una parte significativa si no la totalidad de su actividad en presencia de niveles aumentados de moléculas antiapoptóticas.

La ubicación apical de iFas (o iFADD) en la vía de señalización de la apoptosis puede hacer que sea especialmente vulnerable a los inhibidores de la apoptosis, haciendo que estas moléculas sean menos adecuadas para ser el componente clave de un interruptor de seguridad apoptótico. Las caspasas 3 o 7 podrían parecer adecuadas como moléculas efectoras terminales; sin embargo, no fue posible expresar ninguna de las dos a niveles funcionales en linfocitos T humanos primarios. Por lo tanto, se seleccionó Caspasa-9 como gen de suicidio, debido a que la Caspasa-9 funciona lo suficientemente tarde en la vía de la apoptosis como para esquivar los efectos inhibidores de c-FLIP y los miembros antiapoptóticos de la familia de bcl-2 y además, se pudo expresar la Caspasa-9 de manera estable a niveles funcionales. Aunque, en teoría, el inhibidor de la apoptosis ligado a X (XIAP) podría reducir la activación espontánea de Caspasa-9, la alta afinidad de AP20187 (o AP1903) por $FKBP_{V36}$ podría desplazar a este XIAP asociado de manera no covalente. A diferencia de iFas, $iCasp9_M$ permaneció funcional en una línea de linfocitos T transformados que sobreexpresa moléculas antiapoptóticas, incluyendo bcl-xL.

En el presente documento se presenta un interruptor de seguridad, diseñado específicamente para la expresión a partir de un vector onco-retrovírico por linfocitos T humanos. $iCasp9_M$ puede activarse por AP1903 (o análogos), un inductor químico de la dimerización pequeño que ha demostrado ser seguro a la dosis necesaria para un efecto de eliminación óptimo y a diferencia de ganciclovir o rituximab, no tiene otros efectos biológicos *in vivo*. Por lo tanto, la expresión de este gen de suicidio en linfocitos T para la transferencia adoptiva puede aumentar la seguridad y también ampliar el alcance de las aplicaciones clínicas.

Ejemplo 2: Uso del gen de suicidio iCasp9 para mejorar la seguridad de linfocitos T aloempobrecidos después del trasplante de células madre haploidénticas

En este ejemplo se presentan construcciones de expresión y métodos para usar las construcciones de expresión para mejorar la seguridad de los linfocitos T aloempobrecidos después del trasplante de células madre haploidénticas. Se generó un vector retrovírico que codifica iCasp9 y un marcador de selección (CD19 truncado) como interruptor de seguridad para linfocitos T donantes. Incluso después del aloempobrecimiento (usando inmunotoxina anti-CD25) pueden transducirse, expandirse y posteriormente enriquecerse los linfocitos T donantes mediante selección inmunomagnética de CD19 hasta una pureza >90 %. Las células modificadas conservaban especificidad y funcionalidad antivírica y contenían un subconjunto con fenotipo y función reguladores. La activación de iCasp9 con un dimerizador de molécula pequeña produjo rápidamente una apoptosis >90 %. Aunque la expresión del transgén se reguló negativamente en linfocitos T quiescentes, iCasp9 siguió siendo un eficiente gen de suicidio, ya que su expresión rápidamente se reguló positivamente en los linfocitos T activados (alorreactivos).

Materiales y métodos

Generación de linfocitos T aloempobrecidos

Se generaron células aloempobrecidas de voluntarios sanos, como se ha presentado previamente. En resumen, se cocultivaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos con líneas celulares linfoblastoides (LCL) transformadas con virus de Epstein Barr (EBV) a una relación de respondedor a estimulador de 40:1 en medio asérico (AIM V; Invitrogen, Carlsbad, CA). Tras 72 horas, se eliminaron los linfocitos T activados que expresaban CD25 del cocultivo mediante incubación durante una noche en inmunotoxina RFT5-SMPT-dgA. El aloempobrecimiento se consideró adecuado si la población residual de $CD3^+CD25^+$ era <1 % y la proliferación residual, mediante incorporación de 3H-timidina, era <10 %.

Plásmido y retrovirus

SFG.iCasp9.2A.CD19 consiste en Caspasa-9 inducible (iCasp9) ligada, a través de una secuencia de tipo 2A escindible, a CD19 humano truncado. iCasp9 consiste en una proteína de unión a FK5 06 humano (FKBP12; GenBank AH002 818) con una mutación F36V, conectada a través de un enlazador Ser-Gly-Gly-Gly-Ser a Caspasa-9 humana (CASP9; GenBank NM 001229). La mutación F36V aumenta la afinidad de unión de FKBP12 al homodimerizador sintético, AP20187 o AP1903. El dominio de reclutamiento de caspasa (CAR) se elimina de la secuencia de Caspasa-9 humana debido a que su función fisiológica se ha reemplazado por FKBP12 y su eliminación aumenta la expresión y función del transgén. La secuencia de tipo 2A codifica un péptido de 20 aminoácidos de virus del insecto Thosea asigna, que media una escisión >99 % entre una glicina y un residuo de prolina terminal, dando como resultado 19 aminoácidos adicionales en el extremo C-terminal de iCasp9 y un residuo de prolina adicional en el extremo N-terminal de CD19. CD19 consiste en CD19 de longitud completa (GenBank NM 001770) truncado en el aminoácido 333 (TDPTRRF), lo que acorta el dominio intracitoplasmático de 242 a 19 aminoácidos y elimina todos los residuos de tirosina conservados que son sitios de fosforilación potenciales.

Se produjo un clon PG13 estable que produce retrovirus seudotipado de virus de la leucemia del gibón (Gal-V)

transfectando de manera transitoria la línea celular Phoenix Eco (n.º de producto de la ATCC SD3444; ATCC, Manassas, VA) con SFG.iCasp9.2A.CD19. Esto produjo el retrovirus Eco-seudotipado. Se transdujo tres veces la línea celular empaquetadora PG13 (ATCC) con retrovirus Eco-seudotipado para generar una línea productora que contenía múltiples integrantes províricos de SFG.iCasp9.2A.CD19 por célula. Se llevó a cabo la clonación de células individuales y se expandió el clon de PG13 que producía el título más elevado y se usó para la producción del vector.

Trasducción retrovírica

El medio de cultivo para la activación y expansión de linfocitos T consistía en RPMI 1640 al 45 % (Hyclone, Logan, UT), Clicks al 45 % (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) y suero fetal bovino al 10 % (FBS; Hyclone). Las células aloempobrecidas se activaron mediante anti-CD3 inmovilizado (OKT3; Ortho Biotech, Bridgewater, NJ) durante 48 horas antes de la transducción con vector retrovírico. El aloempobrecimiento selectivo se llevó a cabo cocultivando PBMC donantes con EBV-LCL receptoras para activar a las células alorreactivas: las células activadas expresaron CD25 y posteriormente se eliminaron mediante inmunotoxina anti-CD25. Las células aloempobrecidas se activaron mediante OKT3 y se transdujeron con el vector retrovírico 48 horas después. Se llevó a cabo selección inmunomagnética en el día 4 de la transducción; la fracción positiva se expandió durante 4 días adicionales y se criopreservó.

En experimentos a pequeña escala, se recubrieron placas de 24 pocillos no tratadas para cultivo tisular (Becton Dickinson, San Jose, CA) con 1 g/ml de OKT3 durante de 2 a 4 horas a 37 °C. Las células aloempobrecidas se añadieron a razón de 1 x 10^6 células por pocillo. A las 24 horas, se añadieron 100U/ml de interleucina-2 (IL-2) humana recombinante (Proleukin; Chiron, Emeryville, CA). La transducción retrovírica se llevó a cabo 48 horas después de la activación. Se recubrieron placas de 24 pocillos no tratadas para cultivo tisular con 3,5 µg/cm^2 de fragmento de fibronectina recombinante (CH-296; Retronectina; Takara Mirus Bio, Madison, WI) y se cargaron dos veces los pocillos con sobrenadante que contenía vector retrovírico a 0,5 ml por pocillo durante 30 minutos a 37 °C, tras lo cual se sembraron las células activadas con OKT3 a razón de 5 x 10^5 células por pocillo en sobrenadante que contenía vector retrovírico fresco y medio de cultivo de linfocitos T a una relación de 3:1, complementado con 100U/ml de IL-2. Las células se recogieron después de 2 a 3 días y se expandieron en presencia de 50U/ml de IL-2.

Aumento de escala de la producción de células aloempobrecidas modificadas génicamente

El aumento de escala del proceso de transducción para aplicación clínica empleó matraces T75 no tratados para cultivo tisular (Nunc, Rochester, Nueva York), que se recubrieron con 10 ml de 1 µg/ml de OKT3 o 10 ml de 7 µg/ml de fibronectina a 4 °C durante una noche. También se usaron bolsas de etileno propileno fluorado tratadas con corona para aumentar la adherencia celular (2PF-0072AC, American Fluoroseal Corporation, Gaithersburg, MD). Las células aloempobrecidas se sembraron en matraces recubiertos de OKT3 a razón de 1 x10^6 células/ml. Al día siguiente se añadieron 100U/ml de IL-2. Para la transducción retrovírica, se cargaron una vez matraces o bolsas recubiertos de retronectina con 10 ml del sobrenadante que contenía virus durante de 2 a 3 horas. Los linfocitos T activados con OKT3 se sembraron a razón de 1x10^6 células/ml en medio fresco que contenía vector retrovírico y medio de cultivo de linfocitos T a una relación de 3:1, complementado con 100U/ml de IL-2. Las células se recogieron a la mañana siguiente y se expandieron en matraces T75 o T175 tratados para cultivo tisular en medio de cultivo complementado con entre aproximadamente 50 a 100U/ml de IL-2 a una densidad de siembra de entre aproximadamente 5x 10^5 células/ml a 8x 10^5 células/ml.

Selección inmunomagnética de CD19

La selección inmunomagnética para CD19 se llevó a cabo 4 días después de la transducción. Las células se marcaron con microperlas paramagnéticas conjugadas a anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD19 humano (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) y se seleccionaron en columnas de EM o LS en los experimentos a pequeña escala y en un dispositivo de selección automatizado CliniMacs Plus en los experimentos a gran escala. Las células seleccionadas para CD19 se expandieron durante 4 días más y se criopreservaron en el día 8 después de la transducción. Estas células se denominaron "células aloempobrecidas modificadas génicamente".

Inmunofenotipado y análisis de pentámero

El análisis por citometría de flujo (FACSCalibur y programa informático CellQuest; Becton Dickinson) se llevó a cabo usando los siguientes anticuerpos: CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, CD27, CD28, CD45RA, CD45RO, CD56 y CD62L. Se observó que CD19-PE (clon 4G7; Becton Dickinson) proporcionaba una tinción óptima y se usó en todos los análisis posteriores. Se usó un control no transducido para establecer la ventana lógica negativa para CD19. Un pentámero de HLA, HLA-B8-RAKFKQLL (Proimmune, Springfield, VA) se usó para detectar linfocitos T que reconocen un epítopo del antígeno lítico de EBV (BZLF1). Se usó pentámero de HLA-A2-NLVPMVATV para detectar linfocitos T que reconocían un epítopo del antígeno CMV-pp65.

Ensayo ELISpot de interferón para respuesta antivírica

El ELISpot de interferón para la evaluación de las respuestas a antígenos de EBV, CMV y adenovirus se llevó a cabo usando métodos conocidos. Las células aloempobrecidas modificadas génicamente criopreservadas a los 8 días después de la transducción se descongelaron y dejaron en reposo durante una noche en medio completo sin IL-2 antes de su uso como células respondedoras. Se usaron PBMC criopreservadas del mismo donante como comparadores. Las células respondedoras se sembraron por duplicado o triplicado en diluciones seriadas de $2x10^5$, $1 x10^5$, $5x10^4$ y $2,5 x 10^4$ células por pocillo. Las células estimuladoras se sembraron a razón de $1 x10^5$ por pocillo. Para la respuesta a EBV, se usaron como estimuladores EBV-LCL procedentes del donante irradiadas a 40Gy. Para la respuesta a adenovirus, se usaron monocitos activados procedentes del donante infectados con Ad5f35.

En resumen, se sembraron PBMC donantes en X-Vivo 15 (Cambrex, Walkersville, MD) en placas de 24 pocillos durante una noche, se recogieron a la mañana siguiente, se infectaron con Ad5f35 a una multiplicidad de infección (MOI) de 200 durante 2 horas, se lavaron, se irradiaron a 30Gy y se usaron como estimuladores. Para la respuesta anti-CMV, se usó un proceso similar que usaba adenovirus Ad5f35 que codificaba el transgén pp65 de CMV (Ad5f35-pp65) a una MOI de 5000. Se calcularon las unidades formadoras de puntos (SFU) específicas restando las SFU de los pocillos de ensayo de las de los pocillos de solo respondedor y solo estimulador. La respuesta a CMV fue la diferencia en las SFU entre los pocillos de Ad5f35-pp65 y Ad5f35.

Citotoxicidad específica de EBV

Se estimularon células aloempobrecidas modificadas génicamente con EBVLCL procedentes del donante irradiadas con 40Gy a una relación de respondedor:estimulador de 40:1. Después de 9 días, se volvió a estimular a los cultivos a una relación de respondedor:estimulador de 4:1. La reestimulación se llevó a cabo semanalmente del modo indicado. Después de dos o tres rondas de estimulación, se midió la citotoxicidad en un ensayo de liberación de 51 Cr de 4 horas, usando EBV-LCL de donante como células diana y blastos de OKT3 de donante como controles autólogos. La actividad de NK se inhibió añadiendo un exceso de 30 veces de células K562 frías.

Inducción de la apoptosis con inductor químico de la dimerización, AP20187

Se evaluó la funcionalidad del gen de suicidio añadiendo un homodimerizador sintético de molécula pequeña, AP20187 (Ariad Pharmaceuticals; Cambridge, MA), a una concentración final de 10 nM el día posterior a la selección inmunomagnética de CD19. Las células se tiñeron con anexina V y 7-aminoactinomicina (7-AAD) (BD Pharmingen) a las 24 horas y se analizaron por citometría de flujo. Se consideraron viables las células negativas tanto para anexina V como para 7-AAD, las células que eran positivas para anexina V eran apoptóticas y las células que eran positivas tanto para anexina V como para 7-AAD eran necróticas. Se corrigió respecto de la viabilidad basal el porcentaje de eliminación inducido por la dimerización, como se expone a continuación: Porcentaje de eliminación = 100 % - (% de viabilidad en células tratadas con AP20187 / % de viabilidad en células no tratadas).

Evaluación de la expresión de transgén después del cultivo extendido y la reactivación

Las células se mantuvieron en medio para linfocitos T que contenía 50U/ml de IL-2 hasta los 22 días después de la transducción. Se reactivó una parte de las células en placas de 24 pocillos recubiertas con 1 g/ml de OKT3 y 1 µg/ml de anti-CD28) (clon CD28.2, BD Pharmingen, San Jose, CA) durante de 48 a 72 horas. La expresión de CD19 y la función del gen de suicidio en células tanto reactivadas como no reactivadas se midieron en el día 24 o 25 después de la transducción.

En algunos experimentos, también se cultivaron las células durante 3 semanas después de la transducción y se estimularon con PBCM alogénicas irradiadas con 30G a una relación de respondedor: estimulador de 1:1. Después de 4 días de cocultivo, se trató una parte de las células con AP20187 10 nM. La eliminación se llevó a cabo mediante tinción con anexina V/7-AAD a las 24 horas y se evaluó el efecto del dimerizador en los linfocitos T espectadores específicos para virus mediante el análisis de pentámero en células tratadas con AP20187 y no tratadas.

Linfocitos T reguladores

Se analizó la expresión de CD4, CD25 y Foxp3 en células aloempobrecidas modificadas genéticamente usando citometría de flujo. Para la tinción de Foxp3 humano, se usó el kit de tinción de eBioscience (San Diego, CA) con una IgG2a de control de isotipo de rata adecuada. Estas células se tiñeron con CD25-FITC y CD4-PE superficiales. Se llevó a cabo un análisis funcional cocultivando las células $CD4^+25^+$ seleccionadas tras el aloempobrecimiento y la modificación génica con PBMC autólogas marcadas con N-succinimidil éster de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE). La selección de $CD4^+25^+$ se llevó a cabo en primer lugar empobreciendo las células $CD8^+$ usando microperlas anti-CD 8 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA), seguido de selección positiva usando microperlas anti-CD25 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). El marcaje con CFSE se llevó a cabo incubando PBMC autólogas a $2x10^7$/ml en suero salino tamponado con fosfato que contenía CFSE 1,5 µM durante 10 minutos. La reacción se detuvo añadiendo un volumen equivalente de FBS e incubando durante 10 minutos a 37 °C. Las células se lavaron dos veces antes de su

uso. Las PBMC marcadas con CFSE se estimularon con 500ng/ml de OKT3 y alimentadoras de PBMC alogénicas irradiadas con 40G a una relación de PBMC:alimentador alogénico de 5:1. Después, las células se cultivaron con o sin un número igual de células aloempobrecidas modificadas génicamente $CD4^+25^+$. Después de 5 días de cultivo, se analizó la división celular mediante citometría de flujo; se usó CD19 para descartar de la clasificación los linfocitos T modificados génicamente $CD4^+CD25^+$ no marcados con CFSE.

Análisis estadístico

Se usó la prueba de la t de Student de 2 colas emparejada para determinar la significación estadística de las diferencias entre muestras. Todos los datos se representan como media ± 1 desviación típica.

Resultados

Los linfocitos T aloempobrecidos de manera selectiva pueden transducirse eficazmente con iCasp9 y expandirse

Se llevó a cabo aloempobrecimiento selectivo de acuerdo con procedimientos de protocolo clínico. En resumen, se cocultivaron de 3/6 a 5/6 líneas celulares de PBMC y linfoblastoides (LCL) desemparejadas para HLA. Se aplicó la inmunotoxina RFT5-SMPT-dgA después de 72 horas de cocultivo y se produjeron de manera fiable células aloempobrecidas con una proliferación residual <10 % (media 4,5 ± 2,8 %; intervalo del 0,74 al 9,1 %; 10 experimentos) y que contenían <1 % de células $CD3^+CD25^+$ residuales (media 0,23 ± 0,20 %; intervalo del 0,06 al 0,73 %; 10 experimentos), cumpliendo de este modo los criterios de liberación para el aloempobrecimiento selectivo y sirviendo como materiales de partida para una manipulación posterior.

Las células aloempobrecidas activadas sobre OKT3 inmovilizado durante 48 horas podrían transducirse eficazmente con vector retrovírico seudotipado para Gal-V que codifica SFG.iCasp9.2A.CD19. La eficacia de la transducción evaluada mediante análisis FACS para expresión de CD19 de 2 a 4 días después de la transducción fue de aproximadamente el 53 % ± 8 %, con resultados comparables para la transducción a pequeña escala (placas de 24 pocillos) y a gran escala (matraces T75) (aproximadamente un 55 ± 8 % frente a aproximadamente un 50 % ± 10 % en 6 y 4 experimentos, respectivamente). Los números de células se contrajeron en los primeros 2 días después de la activación con OKT3, de tal forma que tan solo aproximadamente un 61 % ± 12 % (intervalo de aproximadamente el 45 % al 80 %) de las células aloempobrecidas se recuperaron en el día de la transducción. Posteriormente, las células mostraron una expansión significativa, con una expansión media en el intervalo de aproximadamente 94 ± 46 veces (intervalo de aproximadamente 40 a aproximadamente 153) a lo largo de los 8 días posteriores, dando como resultado una expansión neta de 58 ± 33 veces. La expansión celular en los experimentos tanto a pequeña como a gran escala fue similar, con una expansión neta de aproximadamente 45 ± 29 veces (intervalo de aproximadamente 25 a aproximadamente 90) en 5 experimentos a pequeña escala y de aproximadamente 79 ± 34 veces (intervalo de aproximadamente 50 a aproximadamente 116) en 3 experimentos a gran escala.

ΔCD19 permite el enriquecimiento eficaz y selectivo de células transducidas en columnas inmunomagnéticas

En ocasiones, la eficacia de la activación del gen de suicidio depende de la funcionalidad del gen de suicidio en sí y en ocasiones, del sistema de selección usado para enriquecer respecto de células modificadas génicamente. Se investigó el uso de CD19 como marcador de selección para determinar si la selección para CD19 permitía la selección de células modificadas génicamente con una pureza y rendimiento suficientes y si la selección tenía cualquier efecto perjudicial en el crecimiento celular posterior. Se llevó a cabo selección a pequeña escala de acuerdo con las instrucciones del fabricante; sin embargo, se determinó que la selección a gran escala alcanzaba el punto óptimo cuando se usaban 10 l de microperlas para CD19 por cada 1,3 $x10^7$ células. El análisis FACS se llevó a cabo a las 24 horas después de la selección inmunomagnética para minimizar la interferencia de las microperlas anti-CD19. La pureza de las células después de la selección inmunomagnética fue consistentemente superior al 90 %: el porcentaje medio de células $CD19^+$ se encontró en el intervalo de aproximadamente el 98,3 % ± 0,5 % (n=5) en las selecciones a pequeña escala y en el intervalo de aproximadamente el 97,4 % ± 0,9 % (n=3) en las selecciones en CliniMacs a gran escala.

El rendimiento absoluto de las selecciones a pequeña y gran escala fue de aproximadamente el 31 % ± 11 % y de aproximadamente el 28 % ± 6 %, respectivamente; después de la corrección respecto de la eficacia de la transducción. La recuperación media de células transducidas fue de aproximadamente el 54 % ± 14 % en las selecciones a pequeña escala y de aproximadamente el 72 % ± 18 % en las de gran escala. El proceso de selección no tuvo un efecto perjudicial perceptible en la posterior expansión celular. En 4 experimentos, la expansión celular media a lo largo de 3 días después de la selección inmunomagnética de CD19 fue de aproximadamente 3,5 veces para la fracción positiva a CD19 frente a aproximadamente 4,1 veces para las células transducidas no seleccionadas (p=0,34) y de aproximadamente 3,7 veces para las células no transducidas (p=0,75).

Inmunofenotipo de células aloempobrecidas modificadas génicamente

Se inmunofenotipó el producto celular final (células aloempobrecidas modificadas génicamente que se han criopreservado 8 días después de la transducción) y se observó que contenía células tanto CD4 como CD8, con

predominancia de las células CD8, con un 62 % ±11 % de $CD8^+$ frente a un 23 % ± 8 % de $CD4^+$, como se muestra en la tabla a continuación. NS = no significativo, DT = desviación típica.

Tabla 1

	PBMC no manipuladas (% medio ± DT)	Células aloempobrecidas modificadas génicamente (% medio ± DT)	
Linfocitos T: $CD3^+$ total	82 ± 6	95 ± 6	NS
CD3+ 4+	54 ± 5	23 ± 8	p < 0,01
CD3+ 8+	26 ± 9	62 ± 11	p< 0,001
Células NK: $CD3^-$ 56+	6 ± 3	2 ± 1	NS
Fenotipo de memoria			
$CD45RA^+$	66 ± 3	10 ± 5	p<0,001
$CD45RO^+$	26 ± 2	78 ± 7	p<0,001
$CD45RA^-CD62L^+$	19 ± 1	24 ± 7	NS
$CD45RA^-$ $CD62L^-$	9 ± 1	64 ± 7	p<0,001
$CD27^+$ $CD28^+$	67 ± 7	19 ± 9	p<0,001
$CD27^+$ $CD28^-$	7 ± 3	9 ± 4	NS
$CD27^-$ $CD28^+$	4 ± 1	19 ± 8	p<0,05
$CD27^-$ $CD28^-$	22 ± 8	53 ± 18	p<0,05

La mayoría de células fueron $CD45RO^+$ y tenían el inmunofenotipo superficial de linfocitos T efectores de memoria. La expresión de marcadores de memoria, incluyendo CD62L, CD27 y CD28, fue heterogénea. Aproximadamente un 24 % de las células expresó CD62L, una molécula de alojamiento en ganglios linfáticos expresada predominantemente en células de memoria centrales.

Las células aloempobrecidas modificadas génicamente conservaron el repertorio y la funcionalidad antivírica

Se evaluó la capacidad de las células del producto final para mediar la inmunidad antivírica media ELISpot para interferón, ensayo de citotoxicidad y análisis de pentámero. Las células aloempobrecidas modificadas génicamente y crioconservadas se usaron en todos los análisis, ya que eran representativas del producto que se estaba evaluando para su uso en un estudio clínico. Se preservó la secreción de interferón-γ en respuesta a antígenos de adenovirus, CMV o EBV, aunque hubo una tendencia hacia una respuesta anti-EBV reducida en las células aloempobrecidas modificadas génicamente frente a las PBMC no manipuladas. La respuesta a antígenos víricos se evaluó mediante ELISpot en 4 pares de PBMC no manipuladas y células aloempobrecidas modificadas génicamente (GMAC). Los antígenos de adenovirus y CMV se presentaron por monocitos activados procedentes del donante mediante infección con vector nulo Ad5f35 y vector Ad5f35-pp65, respectivamente. Los antígenos de EBV se presentaron por EBV-LCL. Se corrigió el número de unidades formadoras de puntos (SFU) para los pocillos de solo estimulador y solo respondedor. Solo tres de los cuatro donantes fueron evaluables para la respuesta a CMV, se excluyó un donante seronegativo.

La citotoxicidad se evaluó usando EBV-LCL procedentes del donante como dianas. Las células aloempobrecidas modificadas génicamente que se habían sometido a 2 o 3 rondas de estimulación con EBV-LCL procedentes del donante fueron capaces de lisar eficazmente las células autólogas infectadas por virus. Las células aloempobrecidas modificadas génicamente se estimularon con EBV-LCL del donante durante 2 o 3 ciclos. Se llevó a cabo un ensayo de liberación de ^{51}Cr usando EBV-LCL procedentes del donante y blastos OKT3 donantes como diana. La actividad de NK se bloqueó con un exceso de 30 veces de K562 frío. El panel izquierdo muestra los resultados de 5 experimentos independientes usando pares de donante-receptor total o parcialmente desemparejados. El panel derecho muestra los resultados de 3 experimentos usando pares de donante-receptor haploidénticos con HLA no relacionado. Las barras de error indican la desviación típica.

Se usaron EBV-LCL como células presentadoras de antígeno durante el aloempobrecimiento selectivo, por lo que fue posible eliminar significativamente linfocitos T específicos para EBV cuando el donante y el receptor eran haploidénticos. Para investigar esta hipótesis, se incluyeron tres experimentos usando pares de donante-receptor haploidénticos para HLA no relacionados y los resultados mostraron que se conservaba la citotoxicidad contra EBV-LCL procedentes del donante. Los resultados se corroboraron mediante análisis de pentámero para linfocitos T que

reconocían a HLA-B8-RAKFKQLL, un epítopo de antígeno lítico de EBV (BZLF1), en dos donantes informativos después del aloempobrecimiento frente a receptores haploidénticos negativos para HLA-B8. Como comparadores, se usaron PBMC no manipuladas. La población positiva a pentámero RAK se conservó en las células aloempobrecidas modificadas génicamente y se pudo expandir después de varias rondas de estimulación *in vitro* con EBV-LCL procedentes del donante. Conjuntamente, estos resultados indican que las células aloempobrecidas modificadas génicamente conservaron una funcionalidad antivírica significativa.

Linfocitos T reguladores en la población de células aloempobrecidas modificadas génicamente

Se usaron citometría de flujo y análisis funcional para determinar si los linfocitos T reguladores se conservaban en el presente producto de linfocitos T aloempobrecidos modificados génicamente. Se encontró una población $Foxp3^+$ $CD4^+25^+$. Después de la separación inmunomagnética, la fracción enriquecida de $CD4^+CD25^+$ demostró una función supresora cuando se cocultivaron con PBMC autólogas marcadas con CFSE en presencia de OKT3 y se marcaron PBMC alimentadoras procedentes del donante alogénicas con CFSE y se estimularon con OKT3 y alimentadoras alogénicas. Se seleccionaron de manera inmunomagnética células $CD4^+CD25^+$ de la población de células modificadas génicamente y se añadieron a los pocillos de ensayo a una relación de 1:1. La citometría de flujo se llevó a cabo 5 días después. Los linfocitos T modificados génicamente se clasificaron por la expresión de CD19. La adición de células modificadas génicamente $CD4^+CD25^+$ (panel inferior) redujo significativamente la proliferación celular. Por lo tanto, los linfocitos T aloempobrecidos pueden recuperar un fenotipo regulador incluso tras la exposición a inmunotoxina eliminadora de CD25.

Las células aloempobrecidas modificadas génicamente se eliminaron eficaz y rápidamente mediante la adición de inductor químico de la dimerización

Al día siguiente de la selección inmunomagnética, se añadió el inductor químico de la dimerización, AP20187, a 10 nM para inducir la apoptosis, que se produjo en unas 24 horas. El análisis FACS con tinción de anexina V y 7-AAD a las 24 horas mostró que permanecía viable tan solo aproximadamente un 5,5 % ± 2,5 % de las células tratadas con AP20187, mientras que permanecía viable aproximadamente un 81,0 % ± 9,0 % de las células no tratadas. La eficacia de la eliminación después de la corrección respecto de la viabilidad basal fue de aproximadamente un 92,9 % ± 3,8 %. La selección de CD19 a gran escala produjo células que se eliminaron con una eficacia similar a la de la selección a pequeña escala: la viabilidad media con y sin AP20187 y el porcentaje de eliminación, a gran y pequeña escala fueron de aproximadamente un 3,9 %, aproximadamente un 84,0 %, aproximadamente un 95,4 % (n=3) y aproximadamente un 6,6 %, aproximadamente un 79,3 %, aproximadamente un 91,4 % (n=5), respectivamente. AP20187 no fue tóxico para las células no transducidas: la viabilidad con y sin AP20187 fue de aproximadamente un 86 % ± 9 % y un 87 % ± 8 %, respectivamente (n=6).

La expresión y función del transgén se redujeron con el cultivo prolongado pero se recuperaron tras la reactivación celular

Para evaluar la estabilidad de la expresión y función del transgén, se mantuvieron las células en medio de cultivo de linfocitos T y una baja dosis de IL-2 (50U/ml) hasta 24 días después de la transducción. Después, se reactivó una parte de las células con OKT3/anti-CD28. La expresión de CD19 se analizó por citometría de flujo de 48 a 72 horas después y se evaluó la función del gen de suicidio mediante tratamiento con AP20187 10 nM. Lo obtenido es para células del día 5 después de la transducción (es decir, 1 día después de la selección de CD 19) y el día 24 después de la transducción, con o sin 48-72 horas de reactivación (5 experimentos). En 2 experimentos, se llevó a cabo selección de CD25 después de la activación con OKT3/aCD28 para enriquecer adicionalmente las células activadas. Las barras de error representan la desviación típica. * indica $p<0,05$ cuando se compara con células del día 5 después de la transducción. En el día 24, la expresión de CD19 en la superficie se redujo de aproximadamente un 98 % ± 1 % a aproximadamente un 88 % ± 4 % ($p<0,05$) con una reducción en paralelo en la intensidad media de fluorescencia (IMF) de 793 ± 128 a 478 ± 107 ($p<0,05$) (véase la FIG. 13B). De manera similar, hubo una reducción significativa en la función del gen de suicidio: la viabilidad residual fue del 19,6 ± 5,6 % después del tratamiento con AP20187; tras corregir respecto de la viabilidad basal del 54,8 ± 20,9 %, esto equivalía a una eficacia de eliminación de tan solo el 63,1 ± 6,2 %.

Para determinar si la reducción en la expresión del transgén con el tiempo se debía a una transcripción reducida después de la quiescencia de los linfocitos T o a la eliminación de células transducidas, en el día 22 después de la transducción se reactivó una parte de las células con OKT3 y anticuerpo anti-CD28. A las 48 a 72 horas (día 24 o 25 después de la transducción), las células reactivadas con OKT3/aCD28 tuvieron una expresión del transgén significativamente mayor que las células no reactivadas. La expresión de CD19 aumentó de aproximadamente un 88 % ± 4 % a aproximadamente un 93 % ± 4 % ($p <0,01$) y la IMF de CD19 aumentó de 478 ± 107 a 643 ± 174 ($p<0,01$). Además, la función del gen de suicidio también aumentó significativamente de una eficacia de eliminación de aproximadamente el 63,1 % ± 6,2 % a una eficacia de eliminación de aproximadamente el 84,6 % ± 8,0 % ($p<0,01$). Además, se recuperó completamente la eficacia de eliminación en caso de que las células se clasificaran inmunomagnéticamente respecto del marcador de activación CD25: la eficacia de eliminación de las células positivas a CD25 fue de aproximadamente un 93,2 % ± 1,2 %, que era igual que la eficacia de eliminación en el día 5 después de la transducción (93,1 ± 3,5 %). La eliminación de la fracción negativa para CD25 fue del 78,6 ± 9,1 %.

Una observación importante es que se salvaron muchos linfocitos T específicos para el virus cuando se usó dimerizador para eliminar células modificadas génicamente que se habían reactivado con PBMC alogénicas, en lugar de mediante estímulos mitogénicos no específicos. Después de 4 días de reactivación con células alogénicas, como se muestra en las FIG. 14A y 14B, el tratamiento con AP20187 no influye en (y por lo tanto enriquece) las subpoblaciones reactivas con virus, según se mide por la proporción de linfocitos T reactivos con pentámeros de HLA específicos para epítopos procedentes de EBV y CMV. Las células aloempobrecidas modificadas génicamente se mantuvieron en cultivo durante 3 semanas después de la traducción para permitir la modulación negativa del transgén. Las células se estimularon con PBMC alogénicas durante 4 días, tras lo cual se trató a una porción con AP20187 10 nM. Se cuantificó la frecuencia de linfocitos T específicos para EBV y de linfocitos T específicos para CMV mediante análisis de pentámero antes de la aloestimulación, tras la aloestimulación y después del tratamiento de las células aloestimuladas con dimerizador. Después de la aloestimulación, se redujo el porcentaje de linfocitos T específicos para virus. Después del tratamiento con dimerizador, se conservaron parcial y preferencialmente los linfocitos T específicos para virus.

Discusión

En el presente documento se ha demostrado que es factible modificar linfocitos T alogénicos con dos mecanismos de seguridad diferentes, aloempobrecimiento selectivo y modificación con gen de suicidio. En combinación, estas modificaciones pueden potenciar y/o permitir volver a añadir números sustanciales de linfocitos T con actividad antivírica y antitumoral, incluso después del trasplante haploidéntico. Los datos presentados en el presente documento demuestran que el gen de suicidio, iCasp9, funciona eficazmente (apoptosis >90 % después del tratamiento con dimerizador) y que la modulación negativa de la expresión del transgén que se produjo con el paso del tiempo se revirtió rápidamente tras la activación de los linfocitos T, como sucedería cuando los linfocitos T alorreactivos se encuentran con sus dianas. Los datos presentados en el presente documento también demuestran que CD19 es un marcador de selección adecuado que permitió un enriquecimiento eficaz y selectivo de células transducidas hasta una pureza >90 %. Además, los datos presentados en el presente documento indican que estas manipulaciones no tuvieron efectos perceptibles en la competencia inmunológica de los linfocitos T modificados, con conservación de la actividad antivírica y regeneración de una población $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ con actividad de Treg.

Dado que la funcionalidad general de los genes de suicidio depende tanto del gen de suicido en sí como del marcador usado para seleccionar las células transducidas, la traducción en uso clínico requiere de la optimización de ambos componentes y del método usado para emparejar la expresión de los dos genes. Los dos marcadores de selección más ampliamente usados, actualmente en la práctica clínica, tienen cada uno sus inconvenientes. La neomicina fosfotransferasa (neo) codifica una proteína exógena potencialmente inmunogénica y requiere de un cultivo de 7 días en medio de selección, lo que no solo aumenta la complejidad del sistema, sino que también daña potencialmente los linfocitos T específicos para virus. Un marcador de selección superficial ampliamente utilizado, LNGFR, ha planteado problemas en lo relativo a su potencial oncogénico y su potencial correlación con la leucemia, en un modelo de ratón, a pesar de su aparente seguridad clínica. Además, la selección con LNGFR no se encuentra ampliamente disponible, debido a que se usa de manera prácticamente exclusiva en terapia génica. Se ha sugerido un número de marcadores de selección alternativos. Se ha estudiado exhaustivamente CD34 *in vitro*, pero las etapas necesarias para optimizar un sistema configurado principalmente para la selección son progenitores hematopoyéticos escasos y de manera más crítica, el potencial de alojamiento de linfocitos T *in vivo* alterados, hacen que CD34 sea subóptimo para su uso como marcador de selección para una construcción de expresión de interruptor de suicidio. Se seleccionó CD19 como marcador de selección alternativo, debido a que la selección de CD19 de grado clínico se encuentra fácilmente disponible como método para la eliminación de linfocitos B de autoinjertos de células madre. Los resultados presentados en el presente documento demostraron que el enriquecimiento de CD19 podría llevarse a cabo con alta pureza y rendimiento y, además, el proceso de selección no tiene un efecto perceptible en el crecimiento y la funcionalidad posteriores de las células.

La eficacia de la activación del gen de suicidio en células iCasp9 seleccionadas para CD19 se comparó favorablemente con la de células seleccionadas para neo o LNGFR transducidas para expresar el gen HSVtk. Las generaciones anteriores de construcciones de HSVtk proporcionaron un 80-90 % de supresión de la captación de ^{3}H-timidina y mostraron una reducción similar en la eficacia de eliminación tras el cultivo prolongado *in vitro*, aunque sin embargo, eran clínicamente eficaces. Se ha informado de la resolución completa de la GVHD tanto aguda como crónica con tan solo un 80 % de reducción *in vivo* en las células modificadas génicamente circulantes. Estos datos respaldan la hipótesis de que es improbable que la modulación negativa del transgén observada *in vitro* sea un problema debido a que los linfocitos T activados responsables de la GVHD regularán positivamente la expresión del gen de suicidio y por lo tanto se eliminarán de manera selectiva *in vivo*. Se estudiará en un contexto clínico si este efecto es suficiente para permitir la retención de linfocitos T específicos para virus y leucemia *in vivo*. Mediante la combinación del aloempobrecimiento selectivo *in vitro* antes de la modificación del gen de suicidio, puede reducirse significativamente la necesidad de activar el mecanismo del gen de suicidio, maximizando de este modo los beneficios de la readición de terapias a base de linfocitos T.

La alta eficacia del suicidio mediado por iCasp9 observada *in vitro* se ha replicado *in vivo*. En un modelo de xenoinjerto de ratón SCID-humano, más de un 99 % de los linfocitos T modificados con iCasp9 se eliminó tras una sola dosis de dimerizador. AP1903, que tiene una equivalencia funcional y química muy estrecha con AP20187 y

que en la actualidad se ha propuesto para su uso en una aplicación clínica, se ha probado con seguridad en voluntarios humanos sanos y se ha demostrado que es seguro. Se logró un nivel plasmático máximo de entre aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 1275 ng/ml de AP1903 (equivalente a de aproximadamente 7 nM a aproximadamente 892 nM) a lo largo de un intervalo de dosis de 0,01 mg/kg a 1,0 mg/kg administrado como una infusión intravenosa de 2 horas. No hubo sustancialmente efectos adversos significativos. Después de permitir una rápida redistribución en el plasma, la concentración de dimerizador usada *in vitro* sigue siendo fácilmente conseguible *in vivo*.

Han de determinarse y definirse las condiciones de cultivo óptimas para mantener la competencia inmunológica de los linfocitos T modificados con gen de suicidio para cada combinación de interruptor de seguridad, marcador de selección y tipo celular, ya que el fenotipo, el repertorio y la funcionalidad pueden verse afectados por la estimulación usada para la activación de linfocitos T policlonales, el método para la selección de células transducidas y la duración del cultivo. La adición de coestimulación de CD28 y el uso de perlas paramagnéticas con el tamaño de células para generar células modificadas génicamente que se son más similares a las PBMC no manipuladas en cuanto a la relación de CD4:CD8 y la expresión de subconjuntos de marcadores de memoria, incluyendo las moléculas de alojamiento en ganglios linfáticos CD62L y CCR7, puede mejorar la funcionalidad *in vivo* de los linfocitos T modificados génicamente. La coestimulación con CD28 también puede aumentar la eficacia de la transducción retrovírica y la expansión. Sin embargo, de manera interesante, se observó que la adición de coestimulación con CD28 no tenía impacto en la transducción de células aloempobrecidas y el grado de expansión de células mostrado fue mayor cuando se comparó solo con el brazo de anti-CD3 en otros estudios. Además, las células aloempobrecidas modificadas con iCasp9 conservaron una funcionalidad antivírica significativa y aproximadamente una cuarta parte conservó la expresión de CD62L. También se observó la regeneración de linfocitos T reguladores $CD4^+CD25^+Foxp3^+$. Las células aloempobrecidas usadas como material de partida para la activación y transducción pueden haber sido menos sensibles a la adición de anticuerpo anti-CD28 como coestimulación. Los cultivos de PBMC empobrecidas para CD25/EBV-LCL contenían linfocitos T y B que ya expresaban CD86 a un nivel significativamente mayor que las PBMC no manipuladas y por tanto, pueden proporcionar coestimulación. Se ha comunicado que la eliminación de linfocitos T reguladores $CD25^+$ antes de la activación con linfocitos T policlonales con anti-CD3 potencia la competencia inmunológica del producto de linfocitos T finales. A fin de minimizar el efecto del cultivo *in vitro* y la expansión en la competencia funcional, se usó un periodo de cultivo relativamente corto en algunos experimentos presentados en el presente documento, mediante los cuales se expandieron las células durante un total de 8 días después de la transducción llevándose a cabo la selección de CD19 en el día 4.

Finalmente, se demostró el aumento de escala de la producción, de tal forma que puede producirse un producto celular suficiente para tratar a pacientes adultos a dosis de hasta 10^7 células/kg: las células aloempobrecidas pueden activarse y transducirse a razón de $4x10^7$ células por matraz y puede obtenerse un retorno mínimo de 8 veces del producto final seleccionado para CD19 en el día 8 después de la transducción, para producir al menos $3x\ 10^8$ células modificadas génicamente aloempobrecidas por matraz original. El volumen de cultivo aumentado se acomoda fácilmente en matraces o bolsas adicionales.

El aloempobrecimiento y la modificación con iCasp9 presentados en el presente documento pueden mejorar significativamente la seguridad de volver a añadir linfocitos T, en particular después de los aloinjertos de células madre haploidénticas. Esto, a su vez, debería permitir un mayor aumento de escala de la dosis, con mayores probabilidades de producir un efecto contra la leucemia.

Ejemplo 3: CASPALLO - Ensayo clínico de fase 1 de linfocitos T aloempobrecidos transducidos con el gen de suicidio de Caspasa-9 inducible tras el trasplante de células madre haploidénticas

Este ejemplo presenta los resultados de un ensayo clínico de fase 1 usando la estrategia de gen de suicidio alternativo ilustrada en la FIG. 2. En resumen, se cocultivaron células mononucleares de sangre periférica de donante con células linfoblastoides transformadas con EBV irradiadas del receptor (40:1) durante 72 h, se aloempobrecieron con una inmunotoxina para CD25 y después se transdujeron con un sobrenadante retrovírico que portaba el gen de suicidio iCasp9 y un marcador de selección (ΔCD19); ΔCD19 permitió el enriquecimiento hasta >90 % de pureza mediante selección inmunomagnética.

En el presente documento se proporciona un ejemplo de un protocolo para la generación de un producto de terapia celular.

Material de partida

Se obtuvieron hasta 240 ml (en 2 extracciones) de sangre periférica del donante de trasplante de acuerdo con protocolos establecidos. En algunos casos, dependiendo del tamaño del donante y el receptor, se llevó a cabo una leucoforesis para aislar suficientes linfocitos T. También se extrajeron 10cc-30cc de sangre del receptor y se usaron para generar la línea celular linfoblastoide transformada con virus de Epstein Barr (EBV) usada como células estimuladoras. En algunos casos, dependiendo del historial médico y/o de la indicación de un bajo recuento de linfocitos B, las LCL se generaron usando células mononucleares de sangre periférica de un pariente de 1er grado

(por ejemplo, padre, hermano o hijo).

Generación de células aloempobrecidas

Se generaron células aloempobrecidas de los donantes de trasplante como se presenta en el presente documento. Se cocultivaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos con líneas celulares linfoblastoides (LCL) transformadas con virus de Epstein Barr (EBV) a una relación de respondedor a estimulador de 40:1 en medio asérico (AIM V; Invitrogen, Carlsbad, CA). Tras 72 horas, se eliminaron los linfocitos T activados que expresaban CD25 del cocultivo mediante incubación durante una noche en inmunotoxina RFT5-SMPT-dgA. El aloempobrecimiento se considera adecuado si la población residual de $CD3^{+}CD25^{+}$ era <1 % y la proliferación residual, mediante incorporación de ^{3}H-timidina, era <10 %.

Producción de retrovirus

Se generó una línea de clon productor de retrovirus para la construcción de iCasp9-CD19. También se generó un banco celular maestro del productor. La prueba del banco celular maestro se llevó a cabo para excluir la generación de retrovirus competente para replicación e infección por micoplasma, VIH, VHB, VHC y similares. La línea productora se cultivó hasta la confluencia, se recogió el sobrenadante, se filtró, se separó en alícuotas, se congeló rápidamente y se almacenó a -80 °C. Se llevaron a cabo pruebas adicionales en todos los lotes de sobrenadante de retrovirus para excluir los retrovirus competentes para replicación (RCR) y se emitió un certificado de análisis, según el protocolo.

Transducción de células aloempobrecidas

Se transdujeron linfocitos T aloempobrecidos usando fibronectina. Se recubrieron placas o bolsas con fragmento CH-296 de fibronectina recombinante (RetronectinTM, Takara Shuzo, Otsu, Japón). El virus se acopló a Retronectin incubando el sobrenadante de productor en placas o bolsas recubiertas. Después, las células se transfirieron a placas o bolsas recubiertas de virus. Después de la transducción, se expandieron los linfocitos T aloempobrecidos, alimentándolos con IL-2 dos veces a la semana para alcanzar el número suficiente de células según el protocolo.

Selección inmunomagnética de CD19

La selección inmunomagnética para CD19 se llevó a cabo 4 días después de la transducción. Las células se marcan con microperlas paramagnéticas conjugadas a anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD19 humano (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) y se seleccionan en un dispositivo de selección automatizado CliniMacs Plus. Dependiendo del número de células necesario para la infusión clínica, las células o se criopreservaron después de la selección en el CliniMacs o se expandieron adicionalmente con IL-2 y se criopreservaron en el día 6 o el día 8 después de la transducción.

Congelación

Se retiraron alícuotas de células para evaluar la eficacia de la transducción, la identidad, el fenotipo y el cultivo microbiológico para las pruebas de liberación final por la FDA. Las células se criopreservaron antes de la administración de acuerdo con el protocolo.

Fármacos del estudio

RFT5-SMPT-dgA

RFT5-SMPT-dgA es una IgG1 murina anti-CD25 (cadena alfa del receptor de IL-2) conjugado a través de un reticulador heterobifuncional [N-succinimidiloxicarbonil-alfa-metil-d-(2-piridiltio)tolueno] (SMTP) a la cadena A de ricina químicamente desglucosilada (dgA). RFT5-SMPT-dgA se formula en forma de una solución estéril a 0,5 mg/ml.

Homodimerizador sintético, AP1903

Mecanismo de acción: La muerte inducible por AP1903 se logra expresando una proteína quimérica que comprende la porción intracelular del receptor humano (proteína de Caspasa-9), que señaliza la muerte celular apoptótica, fusionado a un dominio de unión a fármaco procedente de la proteína de unión a FK506 humana (FKBP). Esta proteína quimérica permanece quiescente dentro de las células hasta la administración de AP1903, que se reticula con los dominios de FKBP, iniciando la señalización de la Caspasa y la apoptosis. Toxicología: Se ha evaluado AP1903 como Nuevo Fármaco en Investigación (IND) por la FDA y se ha completado con éxito un estudio de fase 1 de seguridad clínica. No se observaron efectos adversos significativos cuando se administró API 903 a lo largo de un intervalo de dosis de 0,01 mg/kg a 1,0 mg/kg.

Farmacología/farmacocinética: Los pacientes recibieron 0,4 mg/kg de AP1903 en forma de una infusión de 2 h -

basándose en los datos de Pk publicados que muestran concentraciones plasmáticas de 10 ng/ml - 1275 ng/ml a lo largo del intervalo de dosis de 0,01 mg/kg a 1,0 mg/kg, con niveles plasmáticos que se reducen a un 18 % y 7 % del máximo a las 0,5 y 2 h después de la dosis.

Perfil de efectos secundarios en seres humanos: No se produjeron eventos adversos graves durante el estudio de fase 1 en voluntarios. La incidencia de eventos adversos fue muy baja después de cada tratamiento, siendo todos los efectos adversos de gravedad leve. Solo un evento adverso se consideró posiblemente relacionado con AP1903. Este fue un episodio de vasodilatación, presentado como "enrojecimiento facial" para 1 voluntario a la dosis de 1,0 mg/kg de AP1903. Este evento se produjo a los 3 minutos después de iniciarse la infusión y se resolvió tras una duración de 32 minutos. Todos los eventos adversos comunicados durante el estudio se consideraron por el investigador como no relacionados o con una relación improbable con el fármaco del estudio. Estos eventos incluyeron dolor torácico, síndrome gripal, halitosis, dolor de cabeza, dolor en el sitio de inyección, vasodilatación, aumento de la tos, rinitis, erupción, hemorragia en las encías y equimiosis.

A los pacientes que desarrollaron GVHD de grado 1 se les trató con 0,4 mg/kg de AP1903 en forma de una infusión de 2 horas. Los protocolos para la administración de AP1903 a pacientes con GVHD de grado 1 se establecieron como se expone a continuación. Los pacientes que desarrollaron GvHD después de la infusión de linfocitos T aloempobrecidos fueron sometidos a biopsia para confirmar el diagnóstico y recibieron 0,4 mg/kg de AP1903 en forma de una infusión de 2 h. Los pacientes con GVHD de grado I inicialmente no recibieron otra terapia, aunque en caso de que mostrasen progresión de la GvHD, se administró terapia convencional para la GvHD de acuerdo con las guías institucionales. A los pacientes que desarrollaron GVHD de grado 2-4 se les administró terapia inmunosupresora sistémica convencional, de acuerdo con las guías institucionales, además del fármaco dimerizador AP1903:

Instrucciones para la preparación e infusión: Se obtuvo AP1903 para inyección en forma de una solución concentrada de 2,33 ml en un vial de 3 ml, a una concentración de 5 mg/ml, (es decir, 11,66 mg por vial). También puede proporcionarse AP1903, por ejemplo, a 8 ml por vial, a 5 mg/ml. Antes de la administración, se diluyó la dosis calculada a 100 ml en suero salino normal al 0,9 % para infusión. Se administró AP1903 para inyección (0,4 mg/kg) en un volumen de 100 ml mediante infusión IV a lo largo de 2 horas, usando un kit para infusión esterilizado que no sea de DEHP ni de óxido de etileno infusión y una bomba de infusión.

La construcción de expresión del gen de suicidio iCasp9 (por ejemplo, SFG.iCasp9.2A.ΔCD19), mostrada en la FIG. 24 consiste en Caspasa-9 inducible (iCasp9) ligada, a través de una secuencia de tipo 2A escindible, a CD19 humano truncado (ΔCD19). iCasp9 incluye una proteína de unión a FK506 humana (FKBP12; GenBank AH002 818) con una mutación F36V, conectada a través de un enlazador Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly a Caspasa-9 humana (CASP9; GenBank NM 001229). La mutación F36V puede aumentar la afinidad de unión de FKBP12 al homodimerizador sintético, AP20187 o AP1903. El dominio de reclutamiento de Caspasa (CARD) se ha eliminado de la secuencia de Caspasa-9 humana y su función fisiológica se ha reemplazado por FKBP12. El reemplazo de CARD con FKBP12 aumenta la expresión y la función del transgén. La secuencia de tipo 2A codifica un péptido de 18 aminoácidos del virus del insecto Thosea asigna, que media una escisión >99 % entre una glicina y un residuo de prolina terminal, dando como resultado 17 aminoácidos adicionales en el extremo C-terminal de iCasp9 y un residuo de prolina adicional en el extremo N-terminal de CD19. Δ CD19 consiste en CD19 de longitud completa (GenBank NM 001770) truncado en el aminoácido 333 (TDPTRRF), lo que acorta el dominio intracitoplasmático de 242 a 19 aminoácidos y elimina todos los residuos de tirosina conservados que son sitios de fosforilación potenciales.

Estudios in vivo

Tres pacientes recibieron linfocitos T iCasp9+ después del trasplante de células madre (SCT) haplo-CD34$^+$, a niveles de dosis de entre aproximadamente 1x10^6 a aproximadamente 3x10^6 células/kg.

Tabla 2: Características de los pacientes y resultado clínico.

Paciente N.º	**Sexo (edad (años))**	**Diagnóstico**	**Estado de la enfermedad en el SCT**	**Días desde el SCT hasta la infusión de linfocitos T**	**Número de células infundidas por kg**	**GvHD aguda**	**Resultado clínico**
P1	M(3)	MDS/AML	CR2	63	1 x 10^6	Grado 1/2 (piel, hígado)	Vivo en CR>12 meses sin GvHD
P2	F(17)	B-ALL	CR2	80 y 112	(1 x 10^6)2	Grado 1 (piel)	Vivo en CR>12 meses sin GvHD
P3	M(8)	T-ALL	PIF/CR1	93	3 x 10^6	Ninguno	Vivo en CR>12 sin GvHD
P4	F(4)	T-ALL	Enfermedad activa	30	3 x 10^6	Grado 1 (piel)	Vivo en CR>12 sin GvHD

Los linfocitos T infundidos se detectaron *in vivo* mediante citometría de flujo ($CD3^+\Delta CD19^+$) p qPCR tan pronto como en el día 7 después de la infusión, con un múltiplo de expansión máximo de 170 ± 5 (día 29±9 después de la infusión), como se ilustra en las FIG. 27, 28 y 29. Dos pacientes desarrollaron aGVHD de grado I/II (véanse las FIG. 31-32) y la administración de AP1903 provocó una supresión de >90 % de células $CD3^+\Delta CD19^+$, a los 30 de la infusión (véanse las FIG. 30, 33 y 34), con una reducción log adicional a las 24 horas y resolución de la aGvHD en el hígado y la piel a las 24 h, lo que demuestra que el transgén de iCasp9 era funcional *in vivo*. Para el paciente dos, se observó la desaparición de la erupción cutánea 24 horas después del tratamiento.

Tabla 3: Pacientes con GvHD (nivel de dosis 1)

Paciente	**SCT a GvHD (días)**	**Linfocitos T a GvHD (días)**	**GvHD (grado/sitio)**
1	77	14	2 (hígado, piel)
2	124	45/13	2 (piel)

Los experimentos *ex vivo* confirmaron estos datos. Además, los linfocitos T aloempobrecidos residuales fueron capaces de expandirse y fueron reactivos a virus (CMV) y hongos (*Aspergillus fumigatus*) (producción de IFN-γ). Estos estudios *in vivo* descubrieron que una sola dosis de fármaco dimerizador puede reducir o eliminar la subpoblación de linfocitos T que provocan GvHD, pero pueden evitar CTL específicas para virus, que posteriormente pueden volver a expandirse.

Reconstitución inmunitaria

Dependiendo de la disponibilidad de células de paciente y reactivos, puede obtenerse estudios de reconstitución inmunitaria (inmunofenotipado, función de linfocitos T y B) a intervalos seriados después del trasplante. Se analizarán varios parámetros que miden la reconstitución inmunitaria resultante de los linfocitos T aloempobrecidos transducidos con iCaspasa. El análisis incluye mediciones repetidas de los recuentos de linfocitos totales, los números de linfocitos T y B CD19 y el análisis FACS de subconjuntos de linfocitos T (CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD27, CD28, CD44, CD62L, CCR7, CD56, CD45RA, CD45RO, receptores de linfocitos T alfa/beta y gamma/delta). Dependiendo de la disponibilidad de linfocitos T de un paciente, también se analizan marcadores celulares reguladores de T, tales como CD41CD251FoxP3. Se extraen aproximadamente 10-60 ml de sangre del paciente, cuando sea posible, 4 horas después de la infusión, semanalmente durante 1 mes, mensualmente durante 9 meses y después a los 1 y 2 años. La cantidad de sangre extraída depende del tamaño del receptor y no supera 1-2 cc/kg en total (permitiendo tomar la sangre para cuidado clínico y evaluación del estudio) en una extracción de sangre cualquiera.

Persistencia y seguridad de los linfocitos T aloempobrecidos

También se llevó a cabo el análisis siguiente en las muestras de sangre periférica para monitorizar la función, la persistencia y la seguridad de los linfocitos T transducidos en los puntos de tiempo indicados en el calendario del estudio:

- Fenotipo mediante citometría de flujo para detectar la presencia de células transgénicas.
- Evaluación de RCR mediante PCR.
- PCR cuantitativa en tiempo real para detectar integrantes retrovíricos.
- La evaluación de RCR mediante PCR se lleva a cabo antes del estudio, a los 3, 6 y 12 meses y después anualmente durante un total de 15 años. Se toman muestras de tejido, células y suero para su uso en futuros estudios para RCR según se requiera por la FDA.

Análisis estadístico y reglas de finalización

La MTD se define como la dosis que provoca GvHD aguda de grado III/IV en como máximo un 25 % de los casos elegibles. La determinación se basa en un método de reevaluación continua modificado (CRM) que usa un modelo logístico con un tamaño de cohorte de 2. Se evalúan tres grupos de dosis, a saber, $1x10^6$, $3x10^6$, $1x10^7$ estimándose previamente las probabilidades de toxicidad al 10 %, 15 % y 30 %, respectivamente. El diseño de CRM producido emplea modificaciones al CRM original acumulando más de un sujeto en cada cohorte, limitando la escalada de la dosis a no más de un nivel de dosis y comenzando el reclutamiento de pacientes al nivel de dosis más bajo que se ha demostrado que es seguro para células no transducidas. El resultado de toxicidad en la cohorte de dosis más baja se usa para actualizar la curva de dosis-toxicidad. La siguiente cohorte de pacientes se asigna al nivel de dosis con una probabilidad de toxicidad asociada más próxima a la probabilidad diana del 25 %. Se continúa este proceso hasta que se han acumulado al menos 10 pacientes en este estudio de escalada de la dosis. Dependiendo de la disponibilidad de pacientes, pueden reclutarse como máximo 18 pacientes en el ensayo de fase 1 o hasta que se hayan tratado 6 pacientes en la presente MTD. La MTD final será la dosis con la probabilidad más próxima a la tasa de toxicidad diana en estos puntos de terminación.

Se llevaron a cabo simulaciones para determinar las características operativas del diseño propuesto y este se comparó con un diseño de escalada de la dosis de 3+3 convencional. El diseño propuesto proporciona mejores estimaciones de la MTD basándose en una mayor probabilidad de declarar el nivel de dosis adecuado como la MTD, proporciona menores números de pacientes acumulados a niveles de dosis inferiores y probablemente ineficaces y mantiene un número medio total inferior de pacientes necesarios para el ensayo. Se espera una curva de dosis-toxicidad poco pronunciada a lo largo del intervalo de dosis propuestas en el presente documento y por lo tanto, pueden llevarse a cabo escaladas de dosis aceleradas sin comprometer la seguridad del paciente. Las simulaciones llevadas a cabo indican que el diseño de CRM modificado no implica un mayor número medio de toxicidades totales, cuando se compara con el diseño convencional (las toxicidades totales equivalen a 1,9 y 2,1, respectivamente).

La GVHD de grado III/IV que se produce a los 45 días después de la infusión inicial de linfocitos T aloempobrecidos se tomará en cuenta en los cálculos de la CRM para determinar la dosis recomendada para la cohorte siguiente. Se lleva a cabo monitorización en tiempo real del resultado de toxicidad del paciente durante el estudio para implementar la estimación de la curva de dosis-toxicidad y determinar el nivel de dosis para la siguiente cohorte de pacientes usando uno de los niveles de dosis preespecificados.
Las toxicidades limitantes del tratamiento incluirán:

- reacciones de grado 4 relacionadas con la infusión,
- fracaso del injerto (definido como una reducción posterior en la ANC a < 500/mm^3 para tres mediciones consecutivas en días diferentes, insensibilidad a la terapia con factor de crecimiento que persiste durante al menos 14 días) que se produce antes de 30 días después de la infusión de TC-T
- eventos adversos no hematológicos y no infecciosos de grado 4, que se producen antes de 30 días después de la infusión
- GVHD aguda de grados 3-4 a los 45 días después de la infusión de TC-T
- muerte relacionada con el tratamiento que se produce antes de 30 días después de la infusión

Las frecuencias de GVHD se resumen usando estadísticas descriptivas, junto con otras medidas de seguridad y toxicidad. Asimismo, se calcularán estadísticas descriptivas para resumir la respuesta clínica y biológica en pacientes que reciben AP1903 debido a GVHD de grado mayor de 1.

Se analizarán varios parámetros que miden la reconstitución inmunitaria resultante de los linfocitos T aloempobrecidos transducidos con iCaspasa. Estos incluyeron mediciones repetidas de los recuentos totales de linfocitos, los números de linfocitos T y B CD19 y el análisis FACS de subconjuntos de linfocitos T (CD3, CD4, CDS, CD16, CD19, CD27, CD44, CD62L, CCR7, CD56, CD45RA, CD45RO, receptores de linfocitos T alfa/beta y gamma/delta). En caso de que haya suficientes linfocitos T para su análisis, también se analizarán marcadores de linfocitos T reguladores, tales como CD4/CD25/FoxP3. Se medirá cada sujeto antes de la infusión y en múltiples puntos de tiempo después de la infusión como se ha presentado anteriormente.

Se presentarán sumarios descriptivos de estos parámetros en el grupo general de pacientes y por grupo de dosis, así como por tiempo de la medición. Se generarán curvas de crecimiento que representan mediciones con el paso del tiempo en un paciente para visualizar patrones generales de reconstitución inmunitaria. También se resumirá en cada punto de tiempo la proporción de células positivas a iCasp9. Se implementarán comparaciones emparejadas de cambios en estos puntos de tiempo con el paso del tiempo en comparación con antes de la infusión usando pruebas de t emparejadas o pruebas de rangos firmados de Wilcoxon.

El análisis longitudinal de cada parámetro de reconstitución inmunitario medido repetidas veces usando el modelo de coeficientes aleatorios. El análisis longitudinal permite la construcción de patrones de modelo de reconstitución inmunitaria por paciente, mientras que se permite variar puntos de corte y pendientes en un paciente. También se usará el nivel de dosis como variable independiente en el modelo para tener en cuenta los diferentes niveles de dosis recibidos por los pacientes. Será posible probar si hay una mejora significativa en la función inmunitaria con el paso del tiempo y de estimaciones de la magnitud de estas mejoras basándose en estimaciones de pendientes y su desviación típica usando el modelo presentado en el presente documento. También se llevará a cabo la evaluación de cualquier indicación de diferencias en las frecuencias de reconstitución inmunitaria entre diferentes niveles de dosis de CTL. Se utilizará la distribución normal con un vínculo de identidad en estos modelos y se implementará usando el procedimiento SAS MIXTO. Se evaluará la suposición de normalidad de los parámetros de reconstitución inmunitaria y pueden efectuarse transformaciones (por ejemplo, log, raíz cuadrada), en caso necesario para lograr la normalidad.

Puede emplearse una estrategia similar a la presentada anteriormente para evaluar la cinética de supervivencia de linfocitos T, su expansión y su persistencia. Se determinará y modelará longitudinalmente con el paso del tiempo la relación de los números absolutos de linfocitos T con el número de células positivas al gen marcador. Una estimación positiva de la pendiente indicará una contribución creciente de linfocitos T para la recuperación inmunitaria. Se evaluará la inmunidad específica de virus de los linfocitos T iCasp9 mediante análisis del número de linfocitos T que liberan IFN gamma, basándose en la estimulación *ex vivo* de CTL específicas de virus usando modelos longitudinales. Se generarán modelos separados para el análisis de las evaluaciones de inmunidad de EBV, CMV y adenovirus.

Finalmente, se resumirá la supervivencia general y libre de enfermedad en la cohorte de pacientes completa usando el método de producto-límite de Kaplan-Meier. A partir de las curvas de Kaplan-Meier puede estimarse la proporción de pacientes que sobreviven y que se encuentra libres de enfermedad a los 100 días y 1 año después del trasplante.

En conclusión, la readición de linfocitos T aloempobrecidos iCasp9$^+$ después del SCT de haplo CD34$^+$ permite una expansión significativa de linfocitos donantes funcionales *in vivo* y una rápida eliminación de linfocitos T alorreactivos con resolución de aGvHD.

Ejemplo 4: Aloempobrecimiento de linfocitos T in vivo

También pueden modificarse los protocolos proporcionados en los ejemplos 1-3 para posibilitar el aloempobrecimiento de linfocitos T *in vivo*. Para extender la estrategia a un mayor grupo de sujetos que podrían beneficiarse de la reconstitución inmunitaria sin GvHD aguda, puede simplificarse el protocolo, proporcionando un método *in vivo* de eliminación de linfocitos T. En el método de aloempobrecimiento antes del tratamiento, como se describe en el presente documento, en primer lugar se prepararon líneas celulares linfoblastoides transformadas con EBV a partir del receptor, que posteriormente actúan como células presentadoras de aloantígeno. Este procedimiento puede tardar hasta 8 semanas y puede fracasar en sujetos pretratados extensamente con una neoplasia maligna, particularmente si han recibido rituximab como componente de su terapia inicial. Posteriormente, se cocultivan linfocitos T donantes con EBV-LCL receptoras y después se tratan los linfocitos T alorreactivos (que expresan el antígeno de activación CD25) con anticuerpo monoclonal conjugado a CD25-ricina. Este procedimiento puede tomar días de trabajo de laboratorio adicionales para cada sujeto.

Puede simplificarse el proceso usando un método de aloempobrecimiento *in vivo*, sumándose a la rápida eliminación *in vivo* observada de linfocitos T alorreactivos mediante fármaco dimerizador y sin atacar a los linfocitos T no estimulados pero reactivos con virus/hongos.

En caso de que se desarrolle GvHD aguda de grado I o mayor, se administra una sola dosis de fármaco dimerizador, por ejemplo, a una dosis de 0,4 mg/kg de AP1903 en forma de una infusión intravenosa de 2 horas. Pueden administrarse hasta 3 dosis adicionales de fármaco dimerizador a intervalos de 48 horas en caso de que persista la GvHD aguda. En sujetos con GvHD aguda de grado II o mayor, pueden combinarse estas dosis adicionales de fármaco dimerizador con esteroides. Para pacientes con GVHD persistente que no pueden recibir dosis adicionales del dimerizador debido a una reacción contra el dimerizador de grado III o IV, puede tratarse al paciente solo con esteroides, después de 0 o 1 dosis del dimerizador.

Generación de linfocitos T terapéuticos

Se obtuvieron hasta 240 ml (en 2 extracciones) de sangre periférica del donante de trasplante de acuerdo con el consentimiento de obtención. En caso necesario, se usa leucoféresis para obtener suficientes linfocitos T; (o bien antes de la movilización de células madre o siete días después de la última dosis de G-CSF). También pueden recogerse 10-30 ml de sangre para hacer pruebas de enfermedades infecciosas, tales como hepatitis y VIH.

Las células mononucleares de sangre periférica se activarán usando anticuerpo anti-CD3 humano (por ejemplo, de Orthotech o Miltenyi) en el día 0 y se expandieron en presencia de interleucina-2 humana recombinante (rhIL-2) en el día 2. Los linfocitos T activados con anticuerpo para CD3 se transducen mediante el vector retrovírico de iCaspasa-9 en matraces o placas recubiertas con fragmento CH-296 de fibronectina recombinante (RetronectinTM, Takara Shuzo, Otsu, Japón). El virus se une a retronectina incubando el sobrenadante productor en placas o matraces recubiertos con retronectin. Después, se transfieren las células a dispositivos de cultivo tisular recubiertos de virus. Después de la transducción, se expanden los linfocitos T alimentándoles con rhIL-2 dos veces a la semana hasta alcanzar el número suficiente de células según el protocolo.
Para asegurar que la mayoría de linfocitos T infundidos portan el gen de suicidio, pueden usarse un marcador de selección, CD19 humano truncado (ΔCD19) y un dispositivo de selección comercial, para seleccionar las células transducidas hasta una pureza >90 %. La selección inmunomagnética para CD19 puede llevarse a cabo 4 días después de la transducción. Las células se marcan con microperlas paramagnéticas conjugadas a anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD19 humano (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) y se seleccionan en un dispositivo de selección automatizado CliniMacs Plus. Dependiendo del número de células necesarias para la infusión clínica, las células pueden criopreservarse después de la selección en el CliniMacs o expandirse adicionalmente con IL-2 y criopreservarse tan pronto se hayan expandido suficientes células (hasta el día 14 desde el inicio de la producción).

Pueden retirarse alícuotas de células para evaluar la eficacia de la transducción, la identidad, el fenotipo, el crecimiento autónomo y el examen microbiológico, según se requiere para las pruebas de liberación final por la FDA. Las células se deben criopreservar antes de la administración.

Administración de linfocitos T

Los linfocitos T transducidos se administran a pacientes de, por ejemplo, entre 30 y 120 días después del trasplante de células madre. Los linfocitos T criopreservados se descongelan y se infunden a través de una vía con suero

salino normal. Para niños, las premedicaciones se dosifican según el peso. Las dosis de células pueden variar entre, por ejemplo, de aproximadamente 1 x 10^4 células/kg a 1 x 10^8 células/kg, por ejemplo, de aproximadamente 1 x 10^5 células/kg a 1 x 10^7 células/kg, de aproximadamente 1 x 10^6 células/kg a 5 x 10^6 células/kg, de aproximadamente 1 x 10^4 células/kg a 5 x 10^6 células/kg, por ejemplo, aproximadamente 1 x 10^4, aproximadamente 1 x 10^5, aproximadamente 2 x 10^5, aproximadamente 3 x 10^5, aproximadamente 5 x 10^5, 6 x 10^5, aproximadamente 7 x 10^5, aproximadamente 8 x 10^5, aproximadamente 9 x 10^5, aproximadamente 1 x 10^6, aproximadamente 2 x 10^6, aproximadamente 3 x 10^6, aproximadamente 4 x 10^6 o aproximadamente 5 x 10^6 células/kg.

Tratamiento de la GvHD

Se trata a los pacientes que desarrollan GVHD aguda de grado ≥1 con 0,4 mg/kg de AP1903 en forma de una infusión de 2 horas. Puede proporcionarse AP1903 para inyección, por ejemplo, en forma de una solución concentrada de 2,33 ml en un vial de 3 ml, a una concentración de 5 mg/ml, (es decir, 11,66 mg por vial). También puede proporcionarse AP1903 en viales de diferentes tamaños, por ejemplo, pueden proporcionarse 8 ml a 5 mg/ml. Antes de la administración, se diluirá la dosis calculada a 100 ml en suero salino normal al 0,9 % para infusión. Puede administrarse AP1903 para inyección (0,4 mg/kg) en un volumen de 100 ml mediante infusión IV a lo largo de 2 horas, usando un kit para infusión esterilizado que no sea de DEHP ni de óxido de etileno infusión y una bomba de infusión.

Tabla 4: *Pauta de tratamiento de la muestra*

Tiempo	**Donador**	**Receptor**
Antes del trasplante	Obtener hasta 240 de sangre o leucoféresis no estimulado del donante de trasplante de médula ósea. Preparar linfocitos T y LCL donantes para estudios de reconstitución inmunitaria posteriores.	
Día 0	Activación de PBMC con anti-CD3	
Día 2	Alimentación con IL-2	
Día 3	Transducción	
Día 4	Expansión	
Día 6	Selección con CD19. Criopreservación (*si se logra la dosis necesaria)	
Día 8	Evaluar la eficacia de la transducción y la funcionalidad del transgén de iCaspasa9 según el fenotipo. Criopreservación (*si aún no se ha llevado a cabo)	
Día 10 o día 12 a día 14	Criopreservación (si aún no se ha llevado a cabo)	
De 30 a 120 días después del trasplante		Descongelar e infundir los linfocitos T 30 a 120 días después de la infusión de células madre.

Pueden seguirse otros métodos para la terapia clínica y la evaluación como se proporcionan, por ejemplo, en los ejemplos 1-3 en el presente documento.

Ejemplo 5: Uso del gen de suicidio iCasp9 para mejorar la seguridad de las terapias con células estromales mesenquimales

Se han infundido células estromales mesenquimales (MSC) en cientos de pacientes hasta la fecha, comunicándose efectos secundarios perjudiciales graves mínimos. Se desconocen los efectos secundarios a largo plazo debido al seguimiento limitado y al tiempo relativamente corto transcurrido desde que se usan las MSC en el tratamiento de enfermedades. Varios modelos han indicado que hay potencial de efectos secundarios y por lo tanto, es deseable un sistema que permita el control sobre el crecimiento y la supervivencia de MSC usadas terapéuticamente. La construcción de vector de expresión de interruptor de suicidio de Caspasa-9 inducible presentado en el presente documento se investigó como método para eliminar MSC *in vivo* e *in vitro*.

Materiales y métodos

Aislamiento de MSC

Se aislaron MSC de donantes sanos. En resumen, se lavaron con RPMI 1640 (HyClone, Logan, UT) bolsas y filtros de recogida de médula ósea de donantes sanos desechadas después de la infusión y se colocaron en matraces de

cultivo en DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) con suero fetal bovino (SFB) al 10 %, alanil-glutamina 2 mM (Glutamax, Invitrogen), 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (Invitrogen). Tras 48 horas, se desechó el sobrenadante y se cultivaron las células en medio de cultivo completo (CCM): α-MEM (Invitrogen) con FBS al 16,5 %, alanil-glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Las células se cultivaron hasta una confluencia menor del 80 % y se volvieron a sembrar a densidades menores, según fuese adecuado.

Inmunofenotipado

Se usaron anticuerpos monoclonales conjugados a ficoeritrina (PE), isotiocianato de fluoresceína (FITC), proteína de peridinina clorofila (PerCP) o aloficocianina (APC) para CD14, CD34, CD45, CD73, CD90, CD105 y CD133 para teñir las MSC. Todos los anticuerpos fueron de Becton Dickinson-Pharmingen (San Diego, CA), excepto cuando se indique. Las muestras de control marcadas con un anticuerpo de isotipo emparejado adecuado se incluyeron en cada experimento. Las células se analizaron mediante clasificación celular activada por fluorescencia FACScan (Becton Dickinson) equipado con un conjunto de filtro para 4 señales de fluorescencia.

Estudios de diferenciación in vitro

Diferenciación adipocítica. Se sembraron MSC ($7{,}5X10^4$ células) en los pocillos de placas de 6 pocillos en medio NH AdipoDiff (Miltenyi Biotech, Auburn, CA). El medio se cambió cada tres días durante 21 días. Las células se tiñeron con solución de Oil Red O (obtenida diluyendo Oil Red O al 0,5 % p/v en isopropanol con agua a una relación 3:2 ratio), tras la fijación con formaldehído al 4 % en suero salino tamponado con fosfato (PBS).

Diferenciación osteogénica. Se sembraron MSC ($4{,}5X10^4$ células) en los pocillos de placas de 6 pocillos en medio NH OsteoDiff (Miltenyi Biotech). El medio se cambió cada tres días durante 10 días. Las células se tiñeron para la actividad de fosfatasa alcalina usando sustrato Fast BCIP/NBT de Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) según las instrucciones del fabricante, tras la fijación con metanol frío.

Diferenciación condroblástica. Se obtuvieron sedimentos de MSC que contenían de $2{,}5X10^5$ a $5X10^5$ células mediante centrifugación en 15 ml o 1,5 ml de tubos cónicos de polipropileno y se cultivaron en medio NH ChondroDiff (Miltenyi Biotech). El medio se cambió cada tres días durante un total de 24 días. Los sedimentos celulares se fijaron en formalina al 4 % en PBS y se procesaron para el seccionamiento en parafina rutinario. Las secciones se tiñeron con azul de alcián o usando inmunofluorescencia indirecta para colágeno de tipo II (anticuerpo monoclonal de ratón anti-colágeno de tipo II MAB8887, Millipore, Billerica, MA) después de la recuperación del antígeno con pepsina (Thermo Scientific, Fremont, CA).

Producción de retrovirus de iCasp9-ΔCD19 y transducción de MCS

El retrovirus SFG.iCasp9.2A.ΔCD19 (iCasp-ΔCD19) consiste en iCasp9 unido, a través de una secuencia de tipo 2A escindible, a CD19 humano truncado (ΔCD19). Como se ha indicado anteriormente, iCasp9 es una proteína de unión a FK506 humana (FKBP12) con una mutación F36V, que aumenta la afinidad de unión de la proteína a un homodimerizador sintético (AP20187 o AP1903), conectado a través de un enlazador de Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly a Caspasa-9 humana, cuyo dominio de reclutamiento (CARD) se ha eliminado, reemplazándose su función por FKBP12.

La secuencia de tipo 2A codifica un péptido de 20 aminoácidos de virus del insecto Thosea asigna, que media una escisión de más del 99 % entre una glicina y un residuo de prolina terminal, para asegurar la separación de iCasp9 y ΔCD19 tras la traducción. ΔCD19 consiste en CD19 humano truncado en el aminoácido 333, que elimina todos los residuos de citosina intracitoplasmáticos conservados que son sitios de fosforilación potenciales. Se produjo un clon PG13 estable que produce retrovirus seudotipado de virus de la leucemia del gibón (Gal-V) transfectando de manera transitoria la línea celular Phoenix Eco (n.º de producto de la ATCC SD3444; ATCC, Manassas, VA) con SFG.iCasp9.2A.ΔCD19, que proporcionó retrovirus Eco-seudotipados. Se transdujo 3 veces la línea celular empaquetadora PG13 (ATCC) con retrovirus Eco-seudotipado para generar una línea productora que contenía múltiples integrantes províricos de SFG.iCasp9.2A.ΔCD19 por célula. Se llevó a cabo la clonación de células individuales y se expandió el clon de PG13 que producía el título más elevado y se usó para la producción del vector. El sobrenadante retrovírico se obtuvo mediante cultivo de las líneas productoras en IMDM (Invitrogen) con FBS al 10 %, alanil-glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. El sobrenadante que contenía el retrovirus se recogió a las 48 y 72 horas después del cultivo inicial. Para la transducción, se sembraron aproximadamente $2x10^4$ MSC/cm^2 en CM en placas de 6 pocillos, o matraces T75 o T175. Tras 24 horas, el medio se reemplazó por sobrenadante vírico diluido 10 veces junto con polibreno (concentración final de 5 µg/ml) y se incubaron las células a 37 °C en CO_2 al 5 % durante 48 horas, tras lo cual se mantuvieron las células en medio completo.

Enriquecimiento celular

Para la selección de MSC positivas a iCasp9-ΔCD19 inducible para experimentos *in vitro*, se enriquecieron las MSC

transducidas con retrovirus para células positivas a CD19 usando perlas magnéticas (Miltenyi Biotec) conjugadas con anti-CD19 (clon 4G7), según las instrucciones del fabricante. Las muestras de células se tiñeron con anticuerpo para CD19 (clon SJ25C1) conjugado con PE o APC para evaluar la pureza de las fracciones celulares.

Estudios de apoptosis in vitro

MSC no diferenciadas. El inductor químico de la dimerización (CID) (AP20187; ARIAD Pharmaceuticals, Cambridge, MA) se añadió a 50 nM a cultivos de MSC transducidas con iCasp9 en medio completo. La apoptosis se evaluó 24 horas después mediante análisis FACS, después de recoger y teñir las células con anexina V-PE y 7-AAD en tampón de unión a anexina V (BD Biosciences, San Diego, CA). Se mantuvieron MSC transducidas con iCasp9 de control en cultivo sin exposición a CID.

MSC diferenciadas. Las MSC transducidas se diferenciaron como se ha presentado anteriormente. Al final del periodo de diferenciación, se añadió CID al medio de diferenciación a 50 nM. Las células se tiñeron de manera adecuada para el tejido que se estaba estudiando, como se ha presentado anteriormente y se usó una tinción de contraste (azul de metileno) para evaluar la morfología nuclear y citoplasmática. En paralelo, se procesaron los tejidos para ensayos de marcaje de extremos cortados de desoxinucleotidil-transferasa dUTP terminal (TUNEL) según las instrucciones del fabricante (Kit de detección de muerte celular *in situ*, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Para cada punto temporal, se tomaron fotografías de cuatro campos al azar a una ampliación final de 40x y se analizaron las imágenes con el programa informático ImageJ, versión 1.43o (NIH, Bethesda, MD). La densidad celular se calculó como el número de núcleos (positividad a DAPI) por unidad de área superficial (en mm^2). Se determinó el porcentaje de células apoptóticas como la relación del número de núcleos con señal TUNEL positiva (positividad a FITC) al número total de núcleos. Los controles se mantuvieron en cultivo sin CID.

Estudios de eliminación in vivo en un modelo murino

Todos los experimentos en ratones se llevaron a cabo de acuerdo con las guías de cría de animales del Baylor College of Medicine. Para evaluar la persistencia de MSC modificadas *in vivo*, se usó un modelo de ratón SCID junto con un sistema de obtención de imágenes *in vivo*. Las MSC se transdujeron con retrovirus que codificaban el gen de proteína fluorescente verde potenciada-luciferasa de luciérnaga (eGFP-FFLuc) solo o junto con el gen de iCasp9-ΔCD19. Las células se clasificaron respecto de su positividad a eGFP mediante clasificación celular activada por fluorescencia usando un citómetro de flujo MoFlo (Beckman Coulter, Fullerton, CA). También se tiñeron células doblemente transducidas con anti-CD19 conjugado a PE y se clasificaron por su positividad a PE. Se inyectó por vía subcutánea a ratones SCID (8-10 semanas de edad) con $5x10^5$ MSC con y sin iCasp9-ΔCD19 en laterales opuestos. Los ratones recibieron dos inyecciones intraperitoneales de 50 µg de CID separadas por 24 horas comenzando una semana después. Para la obtención de imágenes *in vivo* de las MSC que expresaban eGFP-FFLuc, se inyectó a los ratones por vía intraperitoneal D-luciferina (150 mg/kg) y se analizaron usando el sistema de obtención de imágenes Xenogen-IVIS.

Se calculó la luminiscencia total (una medida proporcional al total de MSC marcadas depositadas) en cada punto de tiempo definiendo automáticamente las regiones de interés (ROI) a lo largo de los sitios de implantación de las MSC. Estos ROI incluyeron todas las áreas con señales de luminiscencia al menos un 5 % por encima del fondo. Los recuentos de fotones totales se integraron para cada ROI y se calculó un valor medio. Los resultados se normalizaron de tal forma que el tiempo cero correspondería a una señal del 100 %.

En un segundo conjunto de experimentos, se inyectó una mezcla de $2,5X10^6$ MSC marcadas con eGFP-FFLuc y $2,5X10^6$ MSC marcadas con eGFP-FFLuc, transducidas con iCasp9-ΔCD19 y se inyectaron por vía subcutánea en el lado derecho y los ratones recibieron dos inyecciones intraperitoneales de 50 µg de CID separadas por 24 h comenzando 7 días después. En varios puntos de tiempo después de la inyección de CID, se recogió el sedimento subcutáneo de MSC usando luminiscencia de tejido para identificar y recoger el espécimen humano completo y para minimizar la contaminación de tejido de ratón. Después, se aisló el ADN genómico usando QIAmp® DNA Mini (Qiagen, Valencia, CA). Se usaron alícuotas de 100 ng de ADN en una PCR cuantitativa (qPCR) para determinar el número de copias de cada transgén usando cebadores y sondas específicos (para la construcción eGFP-FFLuc: cebador directo 5'-TCCGCCCTGAGCAAAGAC-3', inverso 5'-ACGAACTCCAGCAGGACCAT-3', sonda 5' FAM, 6-carboxifluorescenína-ACGAGAAGCGCGATC-3' MGBNFQ, inactivador no fluorescente de unión al surco menor; iCasp9-ΔCD19: directo 5'-CTGGAATCTGGCGGTGGAT-3', inverso 5'-CAAACTCTCAAGAGCACCGACAT-3', sonda 5' FAM-CGGAGTCGACGGATT-3' MGBNFQ). Se usaron números conocidos de plásmidos que contenían copias individuales de cada transgén para determinar curvas patrón. Se determinó que aproximadamente 100 ng de ADN aislado de poblaciones "puras" de MSC transducidas solo con eGFP-FFLuc o doblemente transducidas con eGFP-FFLuc e iCasp9 tenían números similares de copias del gen de eGFP-FFLuc (aproximadamente $3,0X10^4$), así como cero y $1,7X10^3$ copias génicas del gen iCasp9-ΔCD19, respectivamente.

Las células humanas no transducidas y los tejidos de ratón tenían cero copias de cualquiera de los dos genes en 100 ng de ADN genómico. Debido a que el número de copias del gen de eGFP es igual en cantidades idénticas de ADN aislado de cualquiera de las dos poblaciones de MSC (negativas o positivas a iCasp9), el número de copias de este gen en ADN aislado de cualquier mezcla de células será proporcional al número total de células positivas a

eGFP-FFLuc (MSC positivas más negativas a iCasp9). Además, debido a que los tejidos negativos a iCasp9 no contribuyen al número de copias de iCasp9, el número de copias del gen de iCasp9 en cualquier muestra de ADN será proporcional al número total de células positivas a iCasp9. Por lo tanto, en caso de que G sea el número total de células positivas a GFP y negativas a iCasp9 y C el número total de células positivas a GFP y positivas a iCasp9,, para cualquier muestra de ADN, $N_{eGFP} = g \cdot (C+G)$ y $N_{iCasp9} = k \cdot C$, donde N representa el número de copias del gen y g y k son constantes relacionadas con el número de copias y el número de células para los genes de eGFP e iCasp9, respectivamente. Por lo tanto $N_{iCasp9}/N_{eGFP} = (k/g) \cdot [C/(C+G)]$, es decir, la relación entre el número de copias de iCasp9 y el número de copias de eGFP es proporcional a la fracción de células doblemente transducidas (positivas a iCasp9) entre las células positivas a eGFP. Aunque se reducirán los valores absolutos de N_{iCasp9} y N_{eGFP} con el aumento de la contaminación por células murinas en cada explante de MSC, para cada punto de tiempo la relación será constante independientemente de la cantidad de tejido murino incluido, ya que ambos tipos de células humanas están físicamente mezclados. Asumiendo tasas similares de apoptosis espontánea en ambas poblaciones (como se documenta mediante cultivo *in vitro*) el cociente entre N_{iCasp9}/N_{eGFP} en cualquier punto de tiempo y aquel en tiempo cero representará el porcentaje de supervivencia de células positivas a iCasp9 después de la exposición a CID. Todas las determinaciones del número de copias se llevaron a cabo por triplicado.

Análisis estadístico

Se usó la prueba de la t de Student de 2 colas emparejada para determinar la significación estadística de las diferencias entre muestras. Todos los datos numéricos se representan como media ± 1 desviación típica.

Resultados

Las MSC se transducen fácilmente con iCasp9-ΔCD19 y mantienen su fenotipo básico

El análisis por citometría de flujo de MSC de 3 donantes sanos mostró que eran uniformemente positivas para CD73, CD90 y CD105 y negativas para los marcadores hematopoyéticos CD45, CD14, CD133 y CD34. La fracción mononuclear adherente aislada de médula ósea fue homogéneamente positiva para CD73, CD90 y CD105 y negativa para marcadores hematopoyéticos. El potencial de diferenciación, de MSC aisladas, en adipocitos, osteoblastos y condroblastos se confirmó en ensayos específicos, demostrando que estas células son MSC auténticas.

Se transdujeron MSC de pases tempranos con un vector retrovírico iCasp9-ΔCD19, que codifica una forma inducible de Caspasa-9. En condiciones de transducción individual óptimas, un 47 ± 6 % de las células expresó CD19, cuya forma truncada se transcribe en cis con iCasp9, sirviendo como subrogado para la transducción exitosa y permitiendo la selección de células transducidas. El porcentaje de células positivas para CD19 fue estable durante más de dos semanas en cultivo, lo que sugiere la ausencia de efectos perjudiciales o ventajosos para el crecimiento de la construcción en las MSC. El porcentaje de células positivas a CD19, un sustituto para la transducción con éxito con iCasp9, permanece constante durante más de 2 semanas. Para abordar adicionalmente la estabilidad de la construcción, se mantuvo en cultivo una población de células positivas a iCasp9 purificadas mediante un clasificador celular activado por fluorescencia (FACS): no se observó una diferencia significativa en el porcentaje de células positivas a CD19 a lo largo de seis semanas (96,5 ± 1,1 % al inicio frente a 97,4 ± 0,8 % después de 43 días, P = 0,46). Por lo demás, el fenotipo de las células iCasp9-CD19 positivas fue sustancialmente idéntico al de las células no transducidas, siendo prácticamente todas las células positivas para CD73, CD90 y CD105 y negativa para marcadores hematopoyéticos, lo que confirma que la manipulación genética de las MSC no modificó sus características básicas.

Las MSC transducidas con iCasp9-ΔCD19 sufren apoptosis selectiva tras la exposición a CID in vitro

El producto génico proapoptótico iCasp9 se activó por un pequeño inductor químico de la dimerización (CID), AP20187, un análogo del tacrolimus que se une al dominio de unión a FK506 presente en el producto de iCasp9. Las MSC no transducidas tienen una tasa de apoptosis espontánea en cultivo de aproximadamente el 18 % (± 7 %) al igual que las células positivas a iCasp9 al inicio (15 ± 6 %, P = 0,47). La adición de CID (50 nM) a los cultivos de MSC tras la transducción con iCasp9-ΔCD19 da como resultado la muerte apoptótica de más de un 90 % de las células positivas a iCasp9 a las 24 horas (93 ± 1 %, P < 0,0001), mientras que las células negativas a iCasp9 conservan un índice de apoptosis similar al de los controles no transducidos (20 ± 7 %, P = 0,99 y P = 0,69 frente a controles no transducidos, con o sin CID; respectivamente) (véanse las FIG. 17A y 70B). Tras la transducción de MSC con iCasp9, se añadió el inductor químico de la dimerización (CID) a 50 nM a los cultivos en medio completo. La apoptosis se evaluó 24 horas después mediante análisis FACS, después de recoger y teñir las células con anexina V-PE y 7-AAD. Un noventa y tres por ciento de las células positivas a iCasp9-CD19 (iCasp pos/CID) se volvieron positivas a anexina frente a solo un 19 % de la población negativa (iCasp neg/CID), una proporción comparable a las MSC de control no transducidas expuestas al mismo compuesto (Control/CID, 15 %) y a células positivas a iCasp9-CD19 no expuestas a CID (iCasp pos/no CID, 13 %) y similar a la tasa apoptótica basal de las MSC no transducidas (Control/no CID, 16 %). Puede lograrse la inmunoselección magnética de células positivas a iCap9-CD19 con un alto grado de pureza. Más de un 95 % de las células seleccionadas se volvieron apoptóticas después de la exposición a CID.

El análisis de una población positiva a iCasp9 altamente purificada en puntos de tiempo posteriores después de una sola exposición a CID muestra que la pequeña fracción de células negativas a iCasp9 se expande y que permanece una población de células iCasp9-positivas, pero estas últimas pueden eliminarse por la exposición repetida a CID. Por lo tanto, no se detectó una población positiva a iCasp9 resistente a la eliminación adicional por CID. Una población de MSC negativas a iCasp9-CD19 surge tan pronto como a las 24 horas después de la introducción de CID. Se espera una población de MSC negativas a iCasp9-CD19, ya que no es realista lograr una población con una pureza del 100 % y ya que las MSC se están cultivando en condiciones que favorecen su rápida expansión *in vitro*. Persiste una población de la población positiva a iCasp9-CD19, como se predice por el hecho de que la eliminación no es eficiente al 100 % (suponiendo, por ejemplo, una eliminación del 99 % de una población 99 % pura, la población resultante tendrá un 49,7 % de células positivas a iCasp9 y un 50,3 % de negativas a iCasp9). Las células supervivientes, sin embargo, pueden eliminarse en instantes posteriores mediante reexposición a CID.

Las MSC transducidas con iCasp9-ΔCD19 mantienen el potencial de diferenciación de las MSC no modificadas y su descendencia se elimina mediante exposición a CID

Para determinar si CID puede eliminar de manera selectiva a la descendencia diferenciada de MSC positivas a iCasp9, se usó selección inmunomagnética para CD19 para aumentar la pureza de la población modificada (>90 % después de una ronda de selección). Las células positivas a iCasp9 seleccionadas de este modo fueron capaces de diferenciarse *in vivo* en todos los linajes de tejido conectivo estudiados (véanse las FIG. 19A-19Q). Las MSC humanas se seleccionaron inmunomagnéticamente respecto de la expresión de CD19 (por tanto, de iCasp9), con una pureza mayor del 91 %. Después del cultivo en medio de diferenciación específico, las células positivas a iCasp9 fueron capaces de dar lugar a linajes adipocíticos (A, Oil Red y azul de metileno), osteoblásticos (B, fosfatasa alcalina-BCIP/NBT y azul de metileno) y condroblásticos (C, azul alcián y rojo nuclear). Estos tejidos diferenciados se dirigen a la apoptosis mediante exposición a CID 50 nM (D-N). Obsérvense los numerosos cuerpos apoptóticos (flechas), la formación de ampollas en la membrana citoplasmática (recuadro) y la pérdida de arquitectura celular (D y E); la amplia positividad a TUNEL en los nódulos condrocíticos (F-H) y los cultivos adipogénicos (I-K) y osteogénicos (L-N), a diferencia de lo observado en controles no tratados transducidos con iCasp9 (condición adipogénica mostrada, O-Q) (F, I, L, O, DAPI; G, J, M, P,TUNEL-FITC; H, K, N, Q, superposición).
Después de 24 horas de exposición a CID 50 nM, se observaron eficiencias de apoptosis por microscopía con formación de ampollas en la membrana, encogimiento de la célula y desprendimiento y presencia de cuerpos apoptóticos a lo largo de los cultivos adipogénicos y osteogénicos. Un ensayo TUNEL mostró la amplia positividad en los cultivos adipogénicos y osteogénicos y los nódulos condrocíticos (véanse las FIG. 19A-19Q), que aumentaron con el paso del tiempo. Después del cultivo en medio de diferenciación adipocítica, las células positivas a iCasp9 dieron lugar a adipocitos. Tras la exposición a CID 50 nM, se observó apoptosis progresiva, evidenciada por una proporción creciente de células positivas a TUNEL. Tras 24 horas, hubo una reducción significativa en la densidad celular (de 584 células/mm2 a <14 células/mm2), habiéndose desprendido prácticamente todas las células apoptóticas de los portaobjetos, impidiendo un cálculo fiable adicional de la proporción de células apoptóticas. Por lo tanto, iCasp9 permaneció funcional, incluso después de la diferenciación de las MSC y su activación da como resultado la muerte de la descendencia diferenciada.

Las MSC transducidas con iCasp9-ΔCD19 sufren apoptosis selectiva tras la exposición in vivo a CID

Aunque las MSC inyectadas por vía intravenosa ya parecen tener un corto tiempo de supervivencia *in vivo*, las células inyectadas localmente pueden sobrevivir durante más tiempo y producir consecuentemente efectos adversos más profundos. Para evaluar la funcionalidad *in vivo* del sistema de suicidio de iCasp9 en dicha situación, se inyectaron MSC por vía subcutánea a ratones SCID. Las MSC se transdujeron por partida doble con los genes de eGFP-FFLuc (previamente presentado) e iCasp9-ΔCD19. También se transdujeron individualmente MSC con eGFP-FFLuc. Las fracciones positivas a eGFP (y positivas a CD19, donde sea aplicable) se aislaron mediante clasificación celular activada por fluorescencia, con una pureza > 95 %. Se inyectó por vía subcutánea a cada animal MSC positivas a iCasp9 y de control (ambas positivas a eGFP-FFLuc) en flancos opuestos. Se evaluó la localización de las MSC usando el sistema de obtención de imágenes Xenogen-IVIS. En otro conjunto de experimentos, se inyectó una mezcla 1:1 de MSC transducidas de manera sencilla y doble por vía subcutánea en el flanco derecho y los ratones recibieron CID como en el caso anterior. El sedimento subcutáneo de MSC se recogió en diferentes puntos de tiempo, se aisló el ADN genómico y se usó qPCR para determinar los números de copias de los genes eGFP-FFLuc e iCasp9-ΔCD19. En estas condiciones, la relación de los números de copias de iCasp9 a eGFP es proporcional a la fracción de células positivas a iCasp9 entre el total de células humanas (véase la sección de Métodos anterior para más detalles). Las proporciones se normalizaron, de tal forma que el tiempo cero corresponde a un 100 % de células positivas a iCasp9. El examen en serie de animales después de la inoculación subcutánea de MSC (antes de la inyección de CID) muestra evidencias de apoptosis espontánea en ambas poblaciones celulares (como se demuestra por una reducción en la señal de luminiscencia general hasta ~20 % de la inicial). Esto se observó previamente después del suministro sistémico y local de MSC en modelos de xenoinjerto.

Los datos de luminiscencia mostraron una pérdida sustancial de MSC humanas durante las primeras 96 h después de la administración local de MSC, incluso antes de la administración de CID, sobreviviendo tan solo aproximadamente un 20 % de las células después de una semana. A partir de ese momento en adelante, sin embargo, hubo diferencias significativas entre la supervivencia de las MSC positivas a iCasp9 con y sin fármaco

dimerizador. Siete días después del implante de MSC, se administraron a los animales dos inyecciones de 50 µg de CID, separadas por 24 horas. Las MSC transducidas con iCasp9 se eliminaron rápidamente por el fármaco, como se demostró por la desaparición de su señal de luminiscencia. Las células negativas para iCasp9 no se vieron afectadas por el fármaco. Los animales a los que no se inyectó el fármaco mostraron persistencia de la señal en ambas poblaciones hasta un mes después del implante de las MSC. Para cuantificar adicionalmente la eliminación celular, se desarrollaron ensayos de qPCR para medir los números de copias de los genes de eGFP-FFLuc e iCasp9-ΔCD19. Se inyectó a los ratones una mezcla 1:1 de MSC transducidas de manera individual y doble y se les administró CID como se ha indicado anteriormente, una semana después del implante de las MSC. Se recogieron explantes de MSC en varios puntos de tiempo, se aisló ADN genómico de las muestras y se llevaron a cabo ensayos de qPCR en cantidades sustancialmente idénticas de ADN. En estas condiciones (véase la sección de Métodos), en cualquier punto de tiempo, la relación de los números de copias de iCasp9-ΔCD19 a eGFP-FFLuc es proporcional a la fracción de células viables positivas a iCasp9. Se observó una eliminación progresiva de células positivas a iCasp9 (>99 %) de tal forma que la proporción de células supervivientes positivas a iCasp9 se redujo al 0,7 % de la población original después de una semana. Por lo tanto, las MSC transducidas con iCasp9 pueden eliminarse selectivamente *in vivo* tras la exposición a CID, pero por lo demás persistieron.

Discusión

En el presente documento se demuestra que es factible modificar MSC humanas para expresar un mecanismo de seguridad usando una proteína de suicidio inducible. Los datos presentados en el presente documento muestran que las MSC pueden transducirse fácilmente con el gen de suicidio iCasp9 acoplado al marcador de selección de la superficie celular, CD19. La expresión de los genes transducidos de manera conjunta es estable tanto en MSC como en su descendencia diferenciada y no altera de manera evidente su fenotipo o potencial de diferenciación. Estas células transducidas pueden eliminarse *in vitro* e *in vivo* cuando se exponen al inductor químico de la dimerización de molécula pequeña adecuado que se une a iCasp9.

Para que una terapia a base de células sea exitosa, las células trasplantadas tienen que sobrevivir el periodo entre su recogida y su última aplicación clínica *in vivo*. Además, una terapia a base de células segura también debe incluir la capacidad para controlar el crecimiento no deseado y la actividad de las células trasplantadas con éxito. Aunque se han administrado MSC a muchos pacientes sin efectos secundarios notables, informes recientes indican que las protecciones adicionales, tales como el interruptor de seguridad presentado en el presente documento, pueden ofrecer métodos de control adicionales sobre las terapias basadas en células a medida que se investiga y aprovecha adicionalmente el potencial de las MSC trasplantadas para modificarse genética y epigenéticamente para potenciar su funcionalidad y para diferenciarse en linajes que incluyen hueso y cartílago. Los sujetos que reciben MSC que se han modificado genéticamente para liberar proteínas biológicamente activas podrían beneficiarse adicionalmente de la seguridad añadida proporcionada por un gen de suicidio.

El sistema de suicidio presentado en el presente documento ofrece varias ventajas potenciales frente a otros sistemas de suicidio conocidos. Las estrategias que implican análogos de nucleósidos, tales como aquellas que combinan timidina quinasa del virus del herpes simple (HSV-tk) con ganciclovir (GCV) y citosina desaminasa bacteriana o de levadura (CD) con 5-fluoro-citosina (5-FC), son dependientes del ciclo celular y es improbable que sean eficaces en los tejidos postmitóticos que pueden formarse durante la aplicación de las MSC a la medicina regenerativa. Además, incluso en los tejidos en proliferación, la fracción mitótica no comprende todas las células, una porción significativa del injerto puede sobrevivir y permanecer disfuncional. En algunos casos, los profármacos necesarios para el suicidio pueden tener por sí mismos usos terapéuticos que por lo tanto se excluyen (por ejemplo, GCV) o pueden ser tóxicos (por ejemplo, 5-FC), ya sea como resultado del metabolismo por órganos no diana (por ejemplo, muchos sustratos de citocromo P450) o debido a la difusión de tejidos vecinos después de la activación por células diana (por ejemplo, CB1954, un sustrato para nitrorreductasa bacteriana).

Por el contrario, los inductores químicos de la dimerización de molécula pequeña presentados en el presente documento no han mostrado evidencias de toxicidad incluso a dosis diez veces mayores que las necesarias para activar a iCasp9. Además, los sistemas enzimáticos no humanos, tales como HSV-tk y DC, comportan un alto riesgo de respuestas inmunitarias destructivas contra las células transducidas. Tanto el gen de suicidio iCasp9 como el marcador de selección CD19, son de origen humano y por lo tanto, tienen menos probabilidades de inducir respuestas inmunitarias no deseadas. Aunque el ligamiento de la expresión del marcador de selección al gen de suicidio por un péptido escindible de tipo 2A de origen no humano podría presentar problemas, el enlazador de tipo 2A tiene 20 aminoácidos de longitud y probablemente es menos inmunogénico que una proteína no humana. Finalmente, la eficacia de la activación del gen de suicidio en células positivas a iCasp9 se compara favorablemente con la eliminación de células que expresan otros sistemas de suicidio, eliminándose un 90 % o más de linfocitos T modificados con iCasp9 después de una sola dosis de dimerizador, a un nivel que es probable que sea clínicamente eficaz.

El sistema de iCasp9 presentado en el presente documento también puede evitar las limitaciones adicionales observadas con otras terapias a base de células y/o a base de interruptores de suicidio. La pérdida de expresión debido al silenciamiento de la construcción transducida se observa con frecuencia después de la transducción con retrovirus de células de mamífero. Las construcciones de expresión presentadas en el presente documento no

mostraron evidencias de dicho efecto. No fue evidente una reducción en la expresión o en la muerte inducida, incluso después de un mes en cultivo.

Otro problema potencial observado en ocasiones en otras terapias a base de células y/o a base de interruptores de suicidio, es el desarrollo de resistencia en las células que tienen genes antiapoptóticos regulados positivamente. Este efecto se ha observado en otros sistemas de suicidio que implican diferentes elementos de las vías de muerte celular programada, tales como Fas. Se eligió iCasp9 como gen de suicidio para las construcciones de expresión presentadas en el presente documento debido a que es menos probable que tengan esta limitación. En comparación con otros miembros de la cascada apoptótica, la activación de Caspasa-9 se produce tarde en la vía apoptótica y por lo tanto, debe esquivar los efectos de muchos, por no decir todos, los reguladores antiapoptóticos, tales como c-FLIP y miembros de la familia de bcl-2.

Una limitación potencial específica para el sistema presentado en el presente documento puede ser la dimerización espontánea de iCasp9, que a su vez podría provocar muerte celular no deseada y escasa persistencia. Se ha observado este efecto en otros sistemas inducibles concretos que utilizan Fas. La observación de baja tasa de muerte espontánea en células transducidas y la persistencia a largo plazo de las células transgénicas *in vivo* indican que esta posibilidad no es una consideración significativa cuando se usan construcciones de expresión basadas en iCasp9.

Los eventos de integración procedentes de la transducción con retrovirus de las MSC pueden potencialmente provocar mutagénesis perjudicial, especialmente cuando hay múltiples inserciones del vector retrovírico, provocando efectos no deseados en el número de copias y/u otros efectos no deseados. Estos efectos no deseados podrían desplazar el beneficio de un sistema de suicido transducido mediante retrovirus. Normalmente pueden minimizarse estos efectos usando sobrenadante retrovírico de grado clínico obtenido de líneas celulares productoras estables y condiciones de cultivo similares para transducir linfocitos T. Los linfocitos T transducidos y evaluados en el presente documento contienen integrantes en el intervalo de aproximadamente 1 a 3 (conteniendo el sobrenadante un intervalo de aproximadamente 1x 10^6 partículas víricas/ml). La sustitución de vectores retrovíricos por lentivíricos podría reducir adicionalmente el riesgo de genotoxicidad, especialmente en células con alta tasa de renovación y potencial de diferenciación.

Aunque una pequeña proporción de las MSC positivas a iCasp9 persiste después de una sola exposición a CID, pueden eliminarse estas células posteriormente después de la reexposición a CID. *In vivo*, se produce una eliminación de > 99 % con dos dosis, pero es probable que se necesiten dosis repetidas de CID para una eliminación máxima en un contexto clínico. Los métodos no limitantes adicionales para proporcionar seguridad adicional cuando se usa un sistema de interruptor de suicidio inducible incluye rondas adicionales de clasificación celular para aumentar adicionalmente la pureza de las poblaciones celulares administradas y el uso de más de un sistema de gen de suicidio para potenciar la eficacia de la eliminación.

La molécula de CD19, que se expresa fisiológicamente en linfocitos B, se seleccionó como marcador de selección para células transducidas, debido a sus potenciales ventajas frente a otros sistemas de selección disponibles, tales como neomicina fosfotransferasa (neo) y receptor de factor de crecimiento nervioso de baja afinidad truncado (ΔLNGFR). El gen "neo" codifica una proteína exógena potencialmente inmunogénica y requiere de un cultivo de 7 días en medio de selección, aumentando la complejidad del sistema y dañando potencialmente a las células seleccionadas. La expresión de ΔLNGFR debería permitir estrategias de aislamiento similares a otros marcadores de la superficie, pero estos no se encuentran ampliamente disponibles para uso clínico y sigue habiendo una preocupación pendiente acerca del potencial oncogénico de ΔLNGFR. Por el contrario, la selección magnética de células positivas a iCasp9 mediante la expresión de CD19 usando un dispositivo de grado clínico se encuentra fácilmente disponible y no ha mostrado efectos notables en el crecimiento o la diferenciación celular posteriores.

El procedimiento usado para la preparación y administración de células estromales mesenquimales que comprenden el interruptor de seguridad de Caspasa-9 también puede usarse para la preparación de células madre embrionarias y de células madre pluripotentes inducibles. Por lo tanto, para los procedimientos indicados en el presente ejemplo, pueden sustituirse las células estromales mesenquimales proporcionadas en el ejemplo por células madre embrionarias o células madre pluripotentes. En estas células, pueden usarse vectores retrovíricos y lentivíricos, con, por ejemplo, promotores de CMV o el promotor de ronina.

Ejemplo 6: Polipéptidos de Caspasa-9 modificados con menor actividad basal y pérdida mínima de CI_{50} de ligando

La señalización basal, señalización en ausencia de agente agonista o de activación, es prevalente en una multitud de biomoléculas. Por ejemplo, se ha observado en más de 60 receptores acoplados a proteína G de tipo silvestre (GPCR) de múltiples subfamilias [1], quinasas, tales como ERK y abl [2], inmunoglobulinas superficiales [3] y proteasas. Se ha barajado la hipótesis de que la señalización basal contribuye a una gran variedad de eventos biológicos, desde el mantenimiento de la pluripotencia de células madre embrionarias, desarrollo y diferenciación de linfocitos B [4-6], diferenciación de linfocitos T [2, 7], desarrollo de timocitos [8], endocitosis y tolerancia a fármacos [9], autoinmunidad [10], hasta el crecimiento y desarrollo de plantas [11]. Aunque su significado biológico no siempre

se entiende o es evidente, una señalización basal defectuosa puede acarrear consecuencias graves. La señalización basal defectuosa de la proteína G_s ha provocado enfermedades, tales como retinitis pigmentosa, ceguera al color, diabetes insípida nefrogénica, resistencia a ACTH familiar e hipercalcemia hipocalciúrica familiar [12, 13].

Incluso aunque la homodimerización del iniciador de tipo silvestre Caspasa-9 es energéticamente desfavorable, haciendo que la mayoría sean monómeros en solución [14-16], la actividad basal de bajo nivel inherente de Caspasa-9 no procesada [15, 17] se ve potenciada en presencia del "apoptosoma" basado en Apaf-1, su regulador alostérico natural [6]. Además, los niveles de expresión y/o la colocalización suprafisiológica podrían ocasionar dimerización impulsada por proximidad, potenciando adicionalmente la activación basal. En el polipéptido de Caspasa-9 no modificado quimérico, la actividad basal de Caspasa-9 innata se redujo significativamente mediante la eliminación del prodominio de reclutamiento de caspasa (CARD) [18], reemplazándolo por el dominio de unión a AP1903 afín de alta afinidad, FKBP12-F36V. Su seguridad como "interruptor de seguridad" antiapoptótico para terapia celular se ha demostrado de sobra en múltiples estudios [18-20]. Aunque su alta especificad y baja actividad basal ha hecho que sea una potente herramienta en terapia celular, a diferencia de los receptores acoplados a proteína G, sigue sin haber en la actualidad "agonistas inversos" [21] para eliminar la señalización basal, que podría ser deseable para la fabricación y en algunas aplicaciones. La preparación de bancos de células maestros ha demostrado ser compleja debido a la alta amplificación de la actividad basal de bajo nivel del polipéptido quimérico. Además, algunas células son más sensibles que otras a la actividad basal de bajo nivel de Caspasa-9, lo que provoca la apoptosis no intencionada de las células transducidas [18].

Para modificar la actividad basal del polipéptido de Caspasa-9 quimérico, se usaron métodos basados en "diseño racional" para modificar 75 mutantes de iCasp9 basándose en residuos que se sabe que desempeñan papeles cruciales en la homodimerización, la inhibición mediada por XIAP o la fosforilación (tabla a continuación) en lugar de "evolución dirigida" [22] que usan múltiples ciclos de exploración como presión selectiva en mutantes generados de manera aleatoria. La activación impulsada por la dimerización de Caspasa-9 se ha considerado un modelo dominante de activación de Caspasa por iniciador [15, 23, 24]. Para reducir la dimerización espontánea, se llevó a cabo mutagénesis de sitio dirigida de residuos cruciales para la homodimerización y por lo tanto de la señalización basal de Caspasa-9. El reemplazo de cinco residuos clave en la hebra β6 (G402-C-F-N-F406), la interfaz de dimerización clave de Caspasa-9, con los de la Caspasa-3 efectora constitutivamente dimérica (C264-I-V-S-M268) la convirtieron en una proteína constitutivamente dimérica insensible a la activación por Apaf-1 son reordenamientos estructurales significativos [25]. Para modificar la homodimerización espontánea, se efectuó la mutagénesis sistémica de los cinco residuos, basándose en química de aminoácidos y en residuos correspondientes a las Caspasas-2, -8, -9 y -10 iniciadoras que existen predominantemente como un monómero en solución [14, 15]. Después de producir y probar veintiocho mutantes de iCasp9 mediante un ensayo de eliminación subrogado a base de fosfatasa alcalina secretada (SEAP) (tabla a continuación), se observó que la mutación de N405Q reducía la señalización basal con un coste moderado (< 10 veces) de una mayor CI_{50} para AP1903. Ya que la proteólisis, normalmente necesaria para la activación de Caspasa, no es absolutamente necesaria para la activación de Caspasa-9 [26], aumentó el "obstáculo" termodinámico para inhibir la auto-proteólisis. Además, debido a que la unión de Caspasa-9 mediada por XIAP atrapa a la Caspasa-9 en un estado monomérico para atenuar su actividad catalítica y basal [14], hubo un esfuerzo para fortalecer la interacción entre XIAP y Caspasa-9 mutagenizando el tetrapéptido crítico para la interacción con XIAP (A316-T-P-F319, D330-A-I-S-S334). A partir de 17 de estos mutantes de iCasp-9, se determinó que la mutación D330A reducía la señalización basal con un coste de CI_{50} de AP1903 mínimo (< 5 veces).

La tercera estrategia estaba basada en hallazgos previamente comunicados de que la Caspasa-9 se inhibe mediante quinasas tras la fosforilación de S144 por PKC-ζ [27], S183 por proteína quinasa A [28], S196 por Akt1 [29] y se activa tras la fosforilación de Y153 por c-abl [30]. Estos "frenos" podrían mejorar la CI_{50} o las sustituciones con residuos miméticos de la fosforilación ("fosfomiméticos") podría aumentar estos "frenos" para reducir la actividad basal. Sin embargo, ninguno de los 15 mutantes de un solo residuo basados en estos residuos redujo con éxito la CI_{50} para AP1903.

Pueden aplicarse métodos tales como los analizados, por ejemplo, en los ejemplos 1-5 y a lo largo de la presente solicitud, con las modificaciones precisas, en caso necesario a los polipéptidos quiméricos de Caspasa-9 modificados, así como a diversas células terapéuticas.

Ejemplo 7: Materiales y métodos

Mutagénesis dirigida al sitio por PCR de Caspasa-9:

Para modificar la señalización basal de Caspasa-9, se llevó a cabo mutagénesis dirigida al sitio basada en la PCR [31] con oligos que contenían mutaciones y Kapa (Kapa Biosystems, Woburn, MA). Después de 18 ciclos de amplificación, se retiró el plásmido parental con la enzima de restricción dependiente de metilación DpnI, que deja intactos los productos de la PCR. Se usaron 2 µl de la reacción resultante para transformar químicamente XL1-blue o DH5α. Posteriormente se identificaron los mutantes positivos mediante secuenciación (SeqWright, Houston, TX).

Mantenimiento de la línea celular y transfección:

Se mantuvieron células HEK293T/16 en pases tempranos (ATCC, Manassas, VA) en IMDM, GlutaMAX™ (Life Technologies, Carlsbad, CA) complementado con FBS al 10 %, 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomicina hasta la transfección en una atmósfera humidificada a 37 °C, con un 5 % de CO_2/95 % de aire. Se transfectaron transitoriamente células en crecimiento en fase logarítmica con de 800 ng a 2 µg de plásmido de expresión que codifica mutantes de iCasp9 y 500 ng de un plásmido de expresión que codifica SEAP dirigido por el promotor SRα por millón de células en tubos cónicos de 15 ml. Se usaron Caspasa-9 catalíticamente inactiva (C285A) (sin el dominio FKBP) o plásmido de expresión "vacío" ("pSH1-null") para mantener constantes los niveles de plásmido total entre transfecciones. Se usó reactivo de transfección GeneJammer® a una relación de 3 µl por ug de ADN plasmídico para transfectar transitoriamente células HEK293T/16 en ausencia de antibióticos. Se añadieron 100 µl o 2 ml de la mezcla de transfección a cada pocillo en una placa de 96 pocillos o de 6 pocillos, respectivamente. Para los ensayos de SEAP, se añadieron diluciones logarítmicas de AP1903 después de un mínimo de 3 horas de incubación después de la transfección. Para los Western blots, se incubaron las células durante 20 minutos con AP1903 (10 nM) antes de la recogida.

Ensayo de fosfatasa alcalina secretada (SEAP):

De veinticuatro a cuarenta y ocho horas después del tratamiento con AP1903, se recogieron ~100 µl de sobrenadantes en una placa de 96 pocillos y se ensayó la actividad de SEAP como se ha analizado [19, 32]. En resumen, después de la desnaturalización por calor a 65 °C durante 45 minutos para reducir el fondo causado por las fosfatasas alcalinas endógenas (y de origen sérico) que son sensibles al calor, se añadieron 5 µl de sobrenadantes a 95 µl de PBS y se añadieron a 100 µl de tampón de sustrato, que contenía 1 µl de fosfato de 4-metilumbeliferilo 100 mM (4-MUP; Sigma, St. Louis, MO) resuspendido en dietanolamina 2 M. La hidrólisis de 4-MUP por SEAP produce un sustrato fluorescente con excitación/emisión (355/460 nm), que puede medirse fácilmente. Se llevaron a cabo ensayos en placas opacas negras de 96 pocillos para minimizar la filtración de fluorescencia entre pocillos. Para examinar tanto la señalización basal como la actividad inducida por AP1903, se cotransfectaron 10^6 células HEK293T/16 en pase temprano con diversas cantidades de Caspasa de tipo silvestre y 500 ng de un plásmido de expresión que usa un promotor de SRα para dirigir a SEAP, un marcador de viabilidad celular. Siguiendo las sugerencias del fabricante, se añadió 1 ml de IMDM+FBS al 10 % sin antibióticos a cada mezcla. Se sembraron 1000 ul de la mezcla en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Se añadieron 100 ul de AP1903 al menos tres horas después de la transfección. Después de la adición de AP1903 durante al menos 24 horas, se transfirieron 100 ul de sobrenadante a una placa de 96 pocillos y se desnaturalizaron por calor a 68 °C durante 30 minutos para inactivar las fosfatasas alcalinas endógenas. Para el ensayo, se hidrolizó sustrato de fosfato de 4-metilumbeliferilo mediante SEAP en 4-metilumbeliferona, un metabolito que puede excitase con 364 nm y detectarse con un filtro de emisión de 448 nm. Ya que SEAP se usa como marcador de viabilidad celular, la lectura de SEAP reducida corresponde a actividades de iCaspasa-9 aumentadas. Por lo tanto, una mayor lectura de SEAP en ausencia de AP1903 podría indicar una menor actividad basal. Los mutantes de caspasa deseados podrían tener señalización basal reducida con sensibilidad aumentada (es decir, menor CI_{50}) para AP1903. El objetivo del estudio es reducir la señalización basal sin interferir significativamente con la CI_{50}.

Análisis de Western blot:

Se trataron células HEK293T/16 transfectadas de manera transitoria con 2 µg de plásmido durante 48-72 horas con AP1903 durante de 7,5 a 20 minutos (como se indica) a 37 °C y posteriormente se lisaron en 500 µl de tampón RIPA (TrisHCl 0,01 M, pH 8,0/NaCl 140 mM/Triton X-100 al 1 %/fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM/desoxicolato de sodio al 1 %/SDS al 0,1 %) con cóctel inhibidor de proteasas Halt™. Los lisados se recogieron y lisaron sobre hielo durante 30 min. Después de sedimentar los restos celulares, se midieron las concentraciones de proteínas de los sobrenadantes superiores en placas de 96 pocillos con el ensayo de proteínas BCA™ del modo recomendado por el fabricante. Se hirvieron 30 µg de proteínas en tampón de muestra de Laemmli (Bio-Rad, Hercules, CA) con 2-mercaptoetanol al 2,5 % durante 5 min a 95 °C antes de separarlo mediante gel de proteína Criterion TGX con Tris/glicina al 10 %. Las membranas se sondaron con anticuerpo policlonal de conejo anti-Caspasa-9 humana a 1/1000 seguido de anticuerpo secundario de cabra anti-F(ab')2 de IgG de conejo conjugado a HRP a 1/10.000 (Bio-Rad). Las bandas de proteínas se detectaron usando sustrato quimioluminiscente Supersignal West Femto. Para asegurar la carga de la muestra, se desmontaron las transferencias a 65 °C durante 1 hora con tampón de desmontaje de transferencias de Western Restore PLUS antes del marcaje con anticuerpo policlonal de conejo anti-actina a 1/10.000. A menos que se indique lo contrario, todos los reactivos se adquirieron de Thermo Scientific.

También pueden usarse los métodos y construcciones analizados en los ejemplos 1-5 y a lo largo de la presente memoria descriptiva para ensayar y usar los polipéptidos de Caspasa-9 modificados.

Ejemplo 8: Evaluación y actividad de polipéptidos modificados de Caspasa-9 quimérica

Comparación de la actividad basal y la actividad inducida por AP1903:

Para examinar tanto la actividad basal como la actividad inducida por AP1903 de los polipéptidos de Caspasa-9

quiméricos modificados, se examinaron las actividades de SEAP de células HEK293T/16 cotransfectadas con SEA y diferentes cantidades de mutantes de iCasp9. iCasp9 D330A, N405Q y D330A-N405Q mostraron una actividad basal significativamente menor que iCasp9 no modificado para células transfectadas con 1 µg de iCasp9 por millón de células (unidades de actividad relativa de SEAP de 148928, 179081, 205772 frente a 114518) o 2 µg de iCasp9 por millón de células (136863, 175529, 174366 frente a 98889). La señalización basal de los tres polipéptidos de Caspasa-9 quiméricos modificados, cuando se transfectaron a 2 µg por millón de células, fue significativamente mayor (valor de $p < 0,05$). iCasp9 D330A, N405Q y D330A-N405Q también mostraron valores de CI_{50} estimados aumentados para AP1903, pero siguen siendo menores de 6 pM (basándose en el ensayo de SEAP), en comparación con 1 pM para TS, haciendo que sean interruptores de la apoptosis potencialmente útiles.

Evaluación de los niveles de expresión de proteína y de la proteólisis:

Para descartar la posibilidad de que la reducción observada en la actividad basal de los polipéptidos de Caspasa-9 quiméricos modificados fuese atribuible a la estabilidad reducida de la proteína o a una variación en la eficacia de transfección y para examinar la autoproteólisis de iCasp9, se ensayaron los niveles de expresión de proteína de variantes de Caspasa-9 en células HEK293T/16 transfectadas. Todos los niveles de proteína del polipéptido de Caspasa-9 no modificado, iCasp9 D330A e iCasp9 D330A-N405Q mostraron niveles de proteína similares en las condiciones de transfección usadas en este estudio. Por el contrario, la banda de iCasp9 N405Q apareció más oscura que las otras, en particular cuando se usaron 2 µg de plásmidos de expresión. La autoproteólisis no fue fácilmente detectable en las condiciones de transfección usadas, probablemente debido a que solo se recogieron células viables. Al volver a transferir la proteína anti-actina se confirmó que se cargaron en cada carril cantidades comparables de lisado. Estos resultados respaldan que la menor señalización basal en los mutantes de iCasp9 D330A, N405Q y D330A-N405Q, observada por los ensayos de SEAP.

Discusión:

Basándose en el ensayo de exploración de SEAP, estos tres polipéptidos quiméricos modificados de Caspasa-9 mostraron una mayor actividad de SEAP independiente de AP1903, en comparación con los transfectantes de iCasp9 TS y por lo tanto, una menor señalización basal. Sin embargo, la doble mutación (D330-N405Q) no logró reducir adicionalmente ni la actividad basal ni la CI_{50} (0,05 nM) frente a los mutantes de un solo aminoácido. Las diferencias observadas no parecieron deberse a la inestabilidad de la proteína o a la cantidad diferencial de plásmidos usados durante la transfección.

Ejemplo 9: Evaluación y actividad de polipéptidos modificados de Caspasa-9 quimérica

La Caspasa-9 inducible posibilita una eliminación autónoma de células independiente del ciclo celular de un modo dependiente de AP1903. La mejora de las características de este polipéptido de Caspasa-9 inducible podría permitir una aplicación aún más amplia. Es deseable reducir la citotoxicidad independiente de ligando de la proteína y aumenta su eliminación a bajos niveles de expresión. Aunque la citotoxicidad independiente de ligando no es una preocupación a niveles de expresión relativamente bajos, puede tener un impacto material cuando los niveles de expresión pueden alcanzar uno o más órdenes de magnitud mayores que en las células diana primarias, tal como durante la producción del vector. Asimismo, las células pueden tener una sensibilidad diferencial a bajos niveles de expresión de caspasa debido al nivel de inhibidores de la apoptosis, tales como XIAP y Bcl-2, que expresan las células. Por lo tanto, para volver a modificar el polipéptido de caspasa para que tenga una menor actividad basal y posiblemente una mayor sensibilidad al ligando AP1903, se diseñaron cuatro estrategias de mutagénesis.

Dominio de dimerización: Aunque la Caspasa-9 es un monómero en solución a niveles fisiológicos, a altos niveles de expresión, como se produce en el "apoptosoma" proapoptótico impulsado por Apaf, la Caspasa-9 puede dimerizar, lo que da lugar a la autoproteólisis en D315 y un gran aumento en la actividad catalítica. Debido a que C285 forma parte del sitio activo, la mutación C285A es catalíticamente inactiva y se usa como construcción de control negativo. La dimerización implica una interacción muy estrecha de cinco residuos en particular, a saber, G402, C403, F404, N405 y F406. Para cada residuo, se construyó una variedad de sustituciones de aminoácidos que representan diferentes clases de aminoácidos (por ejemplo, hidrófobos, polares, etc.). De forma interesante, todos los mutantes en G402 (es decir, G402A, G402I, G402Q, G402Y) y C403P dieron lugar a un polipéptido de caspasa catalíticamente inactivo. Las mutaciones adicionales de C403 (es decir, C403A, C403S y C403T) fueron similares a la caspasa de tipo silvestre y no se siguieron investigando. Todas las mutaciones en F404 redujeron la actividad basal, pero también reflejaron una sensibilidad reducida a la CI_{50}, de ~ 1 log a no medible. En orden de eficacia, son: F404Y > F404T, F404W >> F404A, F404S. Las mutaciones en N405 o bien no tuvieron efecto, como con N405A, aumentaron la actividad basal, como en N405T o redujeron la actividad basal de manera concomitante con un efecto perjudicial pequeño (~5 veces) o más pronunciado en la CI_{50}, como con N405Q y N405F, respectivamente. Finalmente, como con F404, todas las mutaciones en F406 redujeron la actividad basal y reflejaron una sensibilidad reducida a la CI_{50}, de ~1 log a no medible. En orden de eficacia, son: F406A F406W, F406Y > F406T » F406L.

Se construyeron y probaron algunos polipéptidos que tenían mutaciones compuestas en el dominio de dimerización, pero sustituyendo los 5 residuos análogos de otras caspasas, conocidas por ser monómeros (por ejemplo, Caspasa-2, -8, -10) o dímeros (por ejemplo, Caspasa-3) en solución. Los polipéptidos de Caspasa-9, que contienen el cambio

de 5 residuos de Caspasa-2, -3 y -8, junto con una sustitución de alanina AAAAA fueron catalíticamente inactivos, mientras que los residuos equivalentes de Caspasa-10 (ISAQT), dieron lugar a una actividad basal reducida pero una mayor CI_{50}.

En general, basándose en la combinación de actividad basal consistentemente menor, combinada con un efecto tan solo leve en la CI_{50}, se seleccionó N405Q para experimentos adicionales. Para mejorar la eficacia, se probó una versión con codones optimizados del polipéptido de Caspasa-9 modificado que tenía la sustitución N405Q, denominada N405Qco. Este polipéptido pareció ser marginalmente más sensible a AP1903 que el polipéptido de Caspasa-9 con sustitución N405Q de tipo silvestre.

Mutantes de sitio de escisión: Después de la agregación de Caspasa-9 en el apoptosoma o mediante homodimerización forzada por AP1903, se produce la autoproteólisis en D315. Esto crea un nuevo extremo amino en A316, al menos de manera transitoria. De forma interesante, el tetrapéptido recientemente revelado, ^{316}ATPF^{319}, se une al inhibidor de Caspasa-9, XIAP, que compite por la dimerización con Caspasa-9 en sí en el motivo de dimerización, GCFNF, como se ha analizado anteriormente. Por lo tanto, el resultado inicial de la escisión de D315 es la unión a XIAP, atenuando la activación adicional de Caspasa-9. Sin embargo, existe un segundo sitio de escisión de Caspasa en D330, que es la diana de la caspasa efectora aguas abajo, caspasa-3. A medida que se acumula presión proapoptótica, D330 cada vez se escinde más, liberando el péptido pequeño de unión a XIAP en el residuo 316 a 330 y por lo tanto, eliminando a este inhibidor de Caspasa-9 mitigante. Se construyó un mutante de D330A, que redujo la actividad basal, pero no tanto como en N405Q. Mediante el ensayo de SEAP a alto número de copias, también se reveló un ligero aumento en la CI_{50}, pero a bajo número de copias en linfocitos T primarios, hubo de hecho un ligero aumento en la CI_{50} con una eliminación mejorada de las células diana. La mutación en el sitio de autoproteólisis, D315, también redujo la actividad basal, pero esto dio lugar a un gran aumento en la CI_{50}, probablemente debido a que la escisión de D330 es necesaria para la activación de caspasa. Una doble mutación en D315A y D330A, dio lugar a una Caspasa-9 "bloqueada" inactiva que no podía procesarse de manera adecuada.

Se crearon otros mutantes de D330, incluyendo D330E, D330G, D330N, D330S y D330V. La mutación en D327 también previno la escisión en D330, ya que el sitio de escisión de Caspasa-3 consenso es DxxD, pero varias mutaciones de D327 (es decir, D327G, D327K y D327R) junto con F326K, Q328K, Q328R, L329K, L329G y A331K, a diferencia de las mutaciones de D330, no alteró la actividad basal y no se continuaron investigando.

Mutantes de unión a XIAP: Como se ha analizado anteriormente, la autoproteólisis en D315 revela un tetrapéptido de unión a XIAP, ^{316}ATPF^{319}, que "atrae" a XIAP al interior del complejo de Caspasa-9. La sustitución de ATPF por el tetrapéptido de unión a XIAP análogo, AVPI, procedente de inhibidor anti-XIAP mitocondrial, SMAC/DIABLO, podría unirse más estrechamente a XIAP y con menor actividad basal. Sin embargo, esta sustitución de 4 residuos no tuvo ningún efecto. Otras sustituciones en el motivo ATPF variaron de no tener efecto, (es decir, T317C, P318A, F319A) a reducir la actividad basal con un aumento o muy leve (es decir, T317S, leve (es decir, T317A) a elevado (es decir, A316G, F319W) en la CI_{50}. En general, los efectos del cambio del tetrapéptido de unión a XIAP fueron leves; no obstante, se seleccionó T317S para su evaluación en dobles mutaciones (analizado más adelante), ya que los efectos en la CI_{50} fueron los más leves del grupo.

Mutantes de fosforilación: Se informó que un pequeño número de residuos de Caspasa-9 eran las dianas de fosforilaciones inhibidoras (por ejemplo, S144, S183, S195, S196, S307, T317) o activadoras (es decir, Y153). Por lo tanto, se probaron mutaciones que o bien imitaron la fosforilación ("fosfomiméticos") por sustitución con un residuo ácido (por ejemplo, Asp) o que eliminaron la fosforilación. En general, la mayoría de las mutaciones, independientemente de que se hubiese probado un fosfomimético, redujeron la actividad basal. Entre los mutantes con menor actividad basal, las mutaciones en S144 (es decir, S144A y S144D) y S1496D no tuvieron un efecto perceptible en la CI_{50}, los mutantes S183A, S195A y S196A aumentaron levemente la CI_{50} y los mutantes Y153A, Y153A y S307A tuvieron un gran efecto perjudicial en la CI_{50}. Debido a la combinación de una menor actividad basal y un efecto mínimo o incluso nulo en la CI_{50}, se seleccionó S144A para las dobles mutaciones (analizadas más adelante).

Dobles mutantes: A fin de combinar la eficacia ligeramente mejorada de la variante D330A con posibles residuos que podrían reducir adicionalmente la actividad basal, se construyeron y probaron numerosos dobles mutantes D330A. Típicamente, mantuvieron una menor actividad basal, con tan solo un ligero aumento en la CI_{50}, incluyendo 2.^{as} mutaciones en N405Q, S144A, S144D, S183A y S196A. El doble mutante D330A-N405T tenía mayor actividad basal y los dobles mutantes en D330A con Y153A, Y153F y T317E eran catalíticamente inactivos. Se probó una serie de dobles mutantes con baja actividad basal N405Q, pensados para mejorar la eficacia o reducir la CI_{50}. Todos estos parecen similares a N405Q en lo relativo a la baja actividad basal y CI_{50} ligeramente aumentada en relación con CaspaCIDa-1.0, e incluyeron N405Q con S144A, S144D, S196D y T317S.

Se llevaron a cabo ensayos de SEAP para estudiar la actividad basal y la sensibilidad a CID de algunos de los mutantes de dominio de dimerización. N405Q fue el más sensible a AP1903 de los mutantes ensayados con menor actividad basal que la Caspasa-9 TS, según se determinó por un cambio positivo de la señalización independiente de AP1903. F406T fue el menos sensible a CID de este grupo. Se ensayó la actividad de SEAP independiente de dímero de los polipéptidos de caspasa mutantes D330A y N405Q, junto con el doble mutante D330A-N405Q. Los

resultados de múltiples transfecciones (N = 7 a 13) mostraron que N405Q tenía menor actividad basal que D330A y el doble mutante es intermedio.

Obteniendo la CI_{50} media (+ desviación típica, n = 5) de los polipéptidos de caspasa mutantes D330A y N405Q, junto con el doble mutante D330A-N405Q, muestra que D330A es hasta cierto punto más sensible a AP1903 que los mutantes N405Q, pero aproximadamente 2 veces menos sensibles que Caspasa-9 TS en un ensayo de transfección transitoria.

Los ensayos de SEAP se llevaron a cabo usando Caspasa-9 de tipo silvestre (TS), N405Q, C285A inactiva y varios mutantes de T317 en el dominio de unión a XIAP. Los resultados demuestran que T317S y T317A pueden reducir la actividad basal sin un gran cambio en la CI_{50} para APf1903. Por lo tanto, se seleccionó T317S para producir dobles mutantes con N405Q.

Las CI_{50} de los ensayos de SEAP anteriores mostraron que T317A y T317S tienen CI_{50} similares a la del polipéptido de Caspasa-9 de tipo silvestre, a pesar de tener baja actividad basal.

La actividad de SEAP independiente de dímero de varios mutantes D330 mostró que todos los miembros de esta clase ensayados, incluyendo D330A, D330E, D330N, D330V, D330G y D330S, tenían menos actividad basal que Caspasa-9 de tipo silvestre. Se ensayó la activación basal e inducida por AP1903 de las variantes D330A. Ensayo SEAP de células HEK293/16 transfectadas de manera transitoria con 1 o 2 ug de polipéptidos de caspasa mutantes y 0,5 ug de pSH1-kSEAP por millón de células HEK293, 72 horas después de la transfección. Se mezclaron los datos normalizados basados en 2 ug de cada plásmido de expresión (incluyendo TS) con datos normalizados de transfecciones basadas en 1 ug. iCasp9-D330A, -D330E y -D330S mostraron una señalización basal estadísticamente significativa que Caspasa-9 de tipo silvestre.

El resultado de un Western blot mostró que las mutaciones D330 bloquean la escisión en D330, lo que da lugar a una banda pequeña ligeramente mayor (migración más lenta) (marcador de < 20 kDa). Otras transferencias muestran que la mutación de D327 también bloquea la escisión.

Se midieron las intensidades medias de fluorescencia de múltiples clones de PG13 transducidos 5X con retrovirus que codifican los polipéptidos de Caspasa-9 indicados. Una menor actividad basal normalmente se traduce en niveles mayores de expresión del gen de Caspasa-9, junto con el indicador ligado genéticamente, CD19. Los resultados muestran que de media, los genes que expresan el mutante N405Q expresan mayores niveles de CD19, reflejando la menor actividad basal de los mutantes N405Q frente a D330 o de Caspasa-9 TS. Se ensayaron los efectos de varias mutaciones de caspasa en los títulos víricos obtenidos de células empaquetadoras PG13 transducidas de manera cruzada con sobrenadantes de retrovirus basados en la envuelta de VSV-G. Para examinar el efecto de la señalización basal derivada de CaspaCIDa en la producción de línea celular maestra de retrovirus, la línea celular empaquetadora de retrovirus, PG13, se transdujo de manera cruzada cinco veces con sobrenadantes de retrovirus a base de VSV-G en presencia de 4 µg/ml de potenciador de la transfección, polibreno. Las células PG13 transducidas con CaspaCIDa se tiñeron posteriormente con anticuerpo anti-CD19 humano conjugado a PE, como indicación de transducción. Las células PG13 transducidas con CaspaCIDa-D330A, -D330E y -N405Q mostraron una intensidad media de fluorescencia (IMF) de CD19 potenciada, lo que indica mayores números de copias de retrovirus, lo que implica una menor actividad basal. Para examinar más directamente el título vírico de las células PG13 transducidas, se trataron células HT1080 con un sobrenadante vírico y 8 ug/ml de polibreno. Las IMF de CD19 potenciadas de células transducidas con iCasp9-D330A, -N405Q y -D330E frente a iCasp9 TS en células PG13 se correlacionan positivamente con títulos víricos más elevados, como se observa en células HT1080. Debido a los títulos víricos inicialmente bajos (aproximadamente 1E5 unidades de transducción (TU)/ml), no se observaron diferencias en los títulos víricos en ausencia de tratamiento con HAT para aumentar los rendimientos de virus. Tras el tratamiento con medio HAT, las células PG13 transducidas con CaspaCIDa-D330A, -N405Q o -D330E mostraron mayores títulos víricos. El título vírico (unidades de transducción) se calcula con la fórmula: Título vírico = (n.º de células en el día de la transducción) * (% de $CD19^+$)/volumen de sobrenadante (ml). Para investigar adicionalmente el efecto de los mutantes de CaspaCIDa con menor actividad basal, se seleccionaron y expandieron clones individuales (colonias) de células PG13 transducidas con CaspaCIDa. Se observaron clones de CaspaCIDa-N405Q con mayores IMF de CD19 que las otras cohortes.

Se ensayaron los efectos de diversos polipéptidos de caspasa mayormente en copias individuales en linfocitos T primarios. Esto puede reflejar con más precisión cómo se usarán terapéuticamente estos genes de suicidio. Sorprendentemente, los datos demuestran que el mutante D330A es de hecho más sensible a AP1903 a bajos títulos y elimina casi igual de bien que Caspasa-9 TS cuando se evalúa en un ensayo de 24 horas. El mutante N405Q es menos sensible a AP1903 y no puede eliminar a células diana con una eficacia similar a las 24 horas.

Los resultados de la transducción de 6 muestras de linfocitos T independientes de donantes sanos separados mostraron que el mutante D330A (mut) es más sensible a AP1903 que el polipéptido de Caspasa-9 de tipo silvestre.

La Figura 57 muestra la CI_{50} media, el intervalo y la desviación típica de 6 donantes sanos mostrados en la Fig. 56. Estos datos demuestran que la mejora es estadísticamente significativa. El mutante iCasp9-D330A demostró una

citotoxicidad dependiente de AP1903 mejorada en linfocitos T transducidos. Se transdujeron linfocitos T primarios de donantes sanos (n=6) con retrovirus que codificaba iCasp9 mutante o de tipo silvestre o iCasp9-D330A y el marcador de la superficie celular ΔCD19. Después de la transducción, se purificaron los linfocitos T transducidos con icasp9 usando microperlas para CD19 y una columna magnética. Después, se expusieron los linfocitos T a AP1903 (0-100 nM) y se midieron los linfocitos T $CD3^+CD19^+$ mediante citometría de flujo después de 24 horas. La CI_{50} de iCasp9-D330A fue significativamente menor (p=0,002) que iCasp9 de tipo silvestre.

Los resultados de varios mutantes D330, revelaron que los seis mutantes D330 evaluados (D330A, E, N, V, G y S) son más sensibles a AP1903 que el polipéptido de Caspasa-9 de tipo silvestre.

El mutante N405Q, junto con otros mutantes del dominio de dimerización, incluyendo N404Y y N406Y, pueden eliminar linfocitos T diana de manera indistinguible del polipéptido de Caspasa-9 de tipo silvestre o D330A en 10 días. Las células que recibieron AP1903 en el día 0 recibieron una segunda dosis de AP1903 en el día 4. Estos datos respaldan el uso de mutantes de Caspasa-9 de sensibilidad reducida, tales como N405Q, como parte de un interruptor de eficacia regulada.
Los resultados de la optimización de codones del polipéptido de caspasa N405Q, denominado "N405Qco", reveló que la optimización de codones, que probablemente ocasiona un aumento en la expresión tiene un efecto tan solo muy sutil en la función de caspasa inducible. Esto probablemente refleja el uso de codones comunes en el gen de Caspasa-9 original.

El polipéptido de Caspasa-9 tiene una curva de respuesta a la dosis *in vivo*, que podría usarse para eliminar una fracción variable de linfocitos T que expresan el polipéptido de Caspasa-9. Los datos también demuestran que una dosis de 0,5 mg/kg de AP1903 es suficiente para eliminar los linfocitos T más modificados *in vivo*.
Se ensayó la eliminación dependiente de la dosis de AP1903 *in vivo* de linfocitos T transducidos con D330E iCasp9. Se transdujeron linfocitos T con retrovirus SFG-iCasp9-D330E-2A-ΔCD19 y se inyectaron por vía i.v. en ratones inmunodeficientes (NSG). Tras 24 horas, se inyectó a los ratones AP1903 por vía i.p. (0-5 mg/kg). Después de 24 horas adicionales, se sacrificó a los ratones y se aislaron linfocitos del bazo (A) y se analizaron mediante citometría de flujo para la presencia de linfocitos T $CD3^+CD19^+$ humanos. Esto muestra que iCasp9-D330E tiene un perfil de citotoxicidad *in vivo* similar en respuesta a AP1903 que iCasp9 de tipo silvestre.

Conclusiones: Como se ha discutido, a partir de este análisis de 78 mutantes hasta el momento, de las mutaciones de mutante individual, las mutaciones D330 combinan una eficacia hasta cierto punto mejorada con una actividad basal ligeramente reducida. Los mutantes N405Q también son atractivos, ya que tienen una actividad basal muy baja con una eficacia tan solo ligeramente reducida, reflejada por un aumento de 4-5 veces en la CI_{50}. Los experimentos en linfocitos T primarios han demostrado que los mutantes N405Q pueden eliminar eficazmente a células diana, pero con una cinética hasta cierto punto más lenta que los mutantes D330, haciendo que esto sea potencialmente muy útil para un interruptor de suicidio graduado que elimina parcialmente después de una dosis inicial de AP1903 y puede lograrse hasta una eliminación completa tras una segunda dosis de AP1903.

La tabla a continuación proporciona un resumen de la actividad basal y la CI_{50} para varios polipéptidos quiméricos modificados de Caspasa-9 y ensayados de acuerdo con los métodos analizados en el presente documento. Los resultados están basados en un mínimo de dos ensayos de SEAP independientes, excepto para un subconjunto (es decir, A316G, T317E, F326K, D327G, D327K, D327R, Q328K, Q328R, L329G, L329K, A331K, S196A, S196D y los dobles mutantes a continuación: D330A con S144A, S144D o S183A; y N405Q con S144A, S144D, S196D o T317S) que se ensayaron una vez. Se adoptaron cuatro estrategias multibrazo para generar los polipéptidos quiméricos modificados de Caspasa-9. Los polipéptidos de Caspasa-9 "muertos" dejaron de ser sensibles a AP1903. Los dobles mutantes se indican por un guion, por ejemplo, D330A-N405Q indica un polinucleótido de Caspasa-9 modificado que tiene una sustitución en la posición 330 y una sustitución en la posición 405.

Tabla 5 Clases de mutantes de caspasa

Actividad basal	**Dominio de homodimerización**	**Sitios de escisión e interacción con XIAP**	**Fosforilación**	**Dobles mutantes, Misc.**	**Total de mutantes**
Basal reducida y CI_{50} similar			S144A		80
			S144D		*, **predicha**
		T317S	S196D		
Basal reducida pero mayor CI_{50}	**N405Q**	**D330A**	S183A	D330A-N405Q	**Negrita**, Probado en linfocitos T
	^{402}GCFNF^{406}ISAQT (Casp-10)	**D330E**	S195A	D330A-S144A	
	F404Y	**D330G**	S196A	D330A-S144D	
	F406A	**D330N**		D330A-S183A	
	F406W	**D330S**		D330A-S196A	
	F406Y	**D330V**		N405Q-S144A	
	N405Qco	L329E		N405Q-S144D	
		T317A		N405Q-S196D	
				N405Q-T317S	
				**N405Q-S144Aco*	
				**N405Q-T317Sco*	
Basal reducida pero CI_{50} mucho mayor	F404T	D315A	Y153A		
	F404W	A316G	Y153F		
	N405F	F319W	S307A		
	F406T				
Basal y CI_{50} similares	C403A	^{316}ATPF^{319}AVPI (SMAC/Diablo)			
	C403S	T317C			
	C403T	P318A			
	N405A	F319A			

(continuación)

Actividad basal	Dominio de homodimerización	Sitios de escisión e interacción con XIAP	Fosforilación	Dobles mutantes, Misc.	Total de mutantes
Basal aumentada	N405T	T317E		D330A-N405T	
		F326K			
		D327G			
		D327K			
		D327R			
		Q328K			
		Q328R			
		L329G			
		L329K			
		A331K			
Catalíticamente muerto	^{402}GCFNF^{406}AAAAA			C285A	
	^{402}GCFNF^{406}YCSTL (Casp-2)			D315A-D330A	
	^{402}GCFNF^{406}CIVSM (Casp-3)			D330A-Y153A	
	^{402}GCFNF^{406}QPTFT (Casp-8)			D330A-Y153F	
	G402A			D330A-T317E	
	G402I				
	G402Q				
	G402Y				
	C403P				
	F404A				
	F404S				
	F406L				

Referencias bibliográficas citadas en los ejemplos 6-9

1. Seifert, R. y K. Wenzel-Seifert, Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2002. 366(5): p. 381-416.
2. Roose, J.P., et al., T cell receptor-independent basal signaling via Erk and Abl kinases suppresses RAG gene expression. PLoS Biol, 2003. 1(2): p. E53.
3. Tze, L.E., et al., Basal immunoglobulin signaling actively maintains developmental stage in immature B cells. PLoS Biol, 2005. 3(3): p. e82.
4. Schram, B.R., et al., B cell receptor basal signaling regulates antigen-induced Ig light chain rearrangements. J Immunol, 2008. 180(7): p. 4728-41.
5. Randall, K.L., et al., Dock8 mutations cripple B cell immunological synapses, germinal centers and long-lived antibody production. Nat Immunol, 2009. 10(12): p. 1283-91.
6. Kouskoff, V., et al., B cell receptor expression level determines the fate of developing B lymphocytes: receptor editing versus selection. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(13): p. 7435-9.
7. Hong, T., et al., A simple theoretical framework for understanding heterogeneous differentiation of $CD4^+$ T

cells. BMC Syst Biol, 2012. 6: p. 66.
8. Rudd, M.L., A. Tua-Smith, and D.B. Straus, Lck SH3 domain function is required for T-cell receptor signals regulating thymocyte development. Mol Cell Biol, 2006. 26(21): p. 7892-900.
9. Sorkin, A. y M. von Zastrow, Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. 10(9): p. 609-22.
10. Luning Prak, E.T., M. Monestier y R.A. Eisenberg, B cell receptor editing in tolerance and autoimmunity. Ann N Y Acad Sci, 2011. 1217: p. 96-121.
11. Boss, W.F., et al., Basal signaling regulates plant growth and development. Plant Physiol, 2010. 154(2): p. 439-43.
12. Tao, Y.X., Constitutive activation of G protein-coupled receptors and diseases: insights into mechanisms of activation and therapeutics. Pharmacol Ther, 2008. 120(2): p. 129-48.
13. Spiegel, A.M., Defects in G protein-coupled signal transduction in human disease. Annu Rev Physiol, 1996. 58: p. 143-70.
14. Shiozaki, E.N., et al., Mechanism of XIAP-mediated inhibition of Caspase-9. Mol Cell, 2003. 11(2): p. 519-27.
15. Renatus, M., et al., Dimer formation drives the activation of the cell death protease Caspase-9. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001,98(25): p. 14250-5.
16. Shi, Y., Mechanisms of Caspase activation and inhibition during apoptosis. Mol Cell, 2002. 9(3): p. 459-70.
17. Shiozaki, E.N., J. Chai e Y. Shi, Oligomerization and activation of Caspase-9, induced by Apaf-1 CARD. Proc Natl Acad Sci USA, 2002. 99(7): p. 4197-202.
18. Straathof, K.C., et al., An inducible Caspase-9 safety switch for T-cell therapy. Blood, 2005. 105(11): p. 4247-54.
19. MacCorkle, R.A., K.W. Freeman y D.M. Spencer, Synthetic activation of Caspases: artificial death switches. Proc Natl Acad Sci USA, 1998. 95(7): p. 3655-60.
20. Di Stasi, A., et al., Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. N Engl J Med, 2011,365(18): p. 1673-83.
21. Chang, W.C., et al., Modifying ligand-induced and constitutive signaling of the human 5-HT4 receptor. PLoS One, 2007. 2(12): p. e1317.
22. Bloom, J.D. y F.H. Arnold, In the light of directed evolution: pathways of adaptive protein evolution. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106 Supl 1: p. 9995-10000.
23. Boatright, K.M. y G.S. Salvesen, Mechanisms of Caspase activation. Curr Opin Cell Biol, 2003. 15(6): p. 725-31.
24. Boatright, K.M., et al., A unified model for apical Caspase activation. Mol Cell, 2003. 11(2): p. 529-41.
25. Chao, Y., et al., Engineering a dimeric Caspase-9: a re-evaluation of the induced proximity model for Caspase activation. PLoS Biol, 2005. 3(6): p. e183.
26. Stennicke, H.R., et al., Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. J Biol Chem, 1999. 274(13): p. 8359-62.
27. Brady, S.C., L.A. Allan y P.R. Clarke, Regulation of Caspase-9 through phosphorylation by protein kinase C zeta in response to hyperosmotic stress. Mol Cell Biol, 2005. 25(23): p. 10543-55.
28. Martin, M.C., et al., Protein kinase A regulates Caspase-9 activation by Apaf-1 downstream of cytochrome c. J Biol Chem, 2005. 280(15): p. 15449-55.
29. Cardone, M.H., et al., Regulation of cell death protease Caspase-9 by phosphorylation. Science, 1998. 282(5392): p. 1318-21.
30. Raina, D., et al., c-Abl tyrosine kinase regulates Caspase-9 autocleavage in the apoptotic response to DNA damage. J Biol Chem, 2005. 280(12): p. 11147-51.
31. Papworth, C., Bauer, J. C., Braman, J. y Wright, D. A., Site-directed mutagenesis in one day with >80 % efficiency. Strategies, 1996. 9(3): p. 3-4.
32. Spencer, D.M., et al., Functional analysis of Fas signaling *in vivo* using synthetic inducers of dimerization. Curr Biol, 1996. 6(7): p. 839-47.
33. Hsiao, E.C., et al., Constitutive Gs activation using a single-construct tetracycline-inducible expression system in embryonic stem cells and mice. Stem Cell Res Ther, 2011,2(2): p. 11.
34. Waldner, C., et al., Double conditional human embryonic kidney cell line based on FLP and PhiC31 mediated transgene integration. BMC Res Notes, 2011.4: p. 420.

Los polipéptidos de caspasa quiméricos pueden incluir sustituciones de aminoácidos, incluyendo sustituciones de aminoácidos que dan como resultado un polipéptido de caspasa con menor actividad basal. Estos pueden incluir, por ejemplo, iCasp9 D330A, iCasp9 N405Q e iCasp9 D330A N405Q, demostrando una actividad basal de baja a indetectable, respectivamente, con un efecto perjudicial mínimo en su IC_{50} para AP1903 en un ensayo de eliminación subrogada basado en indicador de SEAP.

Ejemplo 10: Ejemplos de secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos particulares

Las siguientes secuencias de nucleótidos proporcionan un ejemplo de una construcción que puede usarse para la expresión de la proteína quimérica y un marcador de CD19. La figura presenta la construcción de SFG.iC9.2A.^{2}CD19.gcst

SEQ ID NO: 1, secuencia de nucleótidos de la secuencia 5'LTR

TGAAAGACCCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGCA
AGGCATGGAAAAATACATAACTGAGAATAGAAAAGTTCAGATCAAGGTCAGGAA
CAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCT
GCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGG
ATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCC
CCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGG
GTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTT
CGCTTCTCGCTTCTGTTCGCGCGCTTATGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCC
ACAACCCCTCACTCGGGGCGCCAGTCCTCCGATTGACTGAGTCGCCCGGGTAC
CCGTGTATCCAATAAACCCTCTTGCAGTTGCATCCGACTTGTGGTCTCGCTGTT
CCTTGGGAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCA

SEQ ID NO: 2, secuencia de nucleótidos de F_v (FKBP12v36 humana)

GGAGTGCAGGTGGAAACCATCTCCCCAGGAGACGGGCGCACCTTCCCCAAGC
GCGGCCAGACCTGCGTGGTGCACTACACCGGGATGCTTGAAGATGGAAAGAAA
GTTGATTCCTCCCGGGACAGAAACAAGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGCAAGCAG
GAGGTGATCCGAGGCTGGGAAGAAGGGGTTGCCCAGATGAGTGTGGGTCAGA
GAGCCAAACTGACTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAG
GCATCATCCCACCACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAAACTGG
AA

SEQ ID NO: 3 secuencia de aminoácidos de Fv (FKBP12v36 humana)

G V Q V E T I S P G D G R T F P K R G Q T C V V H Y T G M L
E D G K K V D S S R D R N K P F K F M L G K Q E V I R G W E
E G V A Q M S V G Q R A K L T I S P D Y A Y G A T G H P G I I
P P H A T L V F D V E L L K L E

SEQ ID NO: 4, secuencia de nucleótidos del enlazador GS
TCTGGCGGTGGATCCGGA

SEQ ID NO: 5, secuencia de aminoácidos del enlazador GS
S G G G S G

SEQ ID NO: 6, secuencia de nucleótidos de enlazador (entre el enlazador GS y Casp 9)
GTCGAC

SEQ ID NO: 7, secuencia de aminoácidos de enlazador (entre el enlazador GS y Casp 9)
VD

SEQ ID NO: 8, secuencia de nucleótidos de Casp 9 (truncada)

GGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCT
TACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAAC
TTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGA

GAAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCG
ACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCAGCAGGAC
CACGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCTGTCAGGC
CAGCCACCTGCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGT
CGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGA
GGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCA
TGGGTTTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACC
CCGAGCCAGATGCCACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTG
GACGCCATATCTAGTTTGCCCACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT
TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAG
ACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCT
CCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAGATGCC
TGGTTGCTTTAATTTCCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAAACATCA

SEQ ID NO: 9, secuencia de aminoácidos de Caspasa-9 (truncada)-dominio CARD eliminado

G F G D V G A L E S L R G N A D L A Y I L S M E P C G H C L I
I N N V N F C R E S G L R T R T G S N I D C E K L R R R F S S
L H F M V E V K G D L T A K K M V L A L L E L A Q Q D H G A L
D C C V V V I L S H G C Q A S H L Q F P G A V Y G T D G C P V
S V E K I V N I F N G T S C P S L G G K P K L F F I Q A C G G
E Q K D H G F E V A S T S P E D E S P G S N P E P D A T P F
Q E G L R T F D Q L D A I S S L P T P S D I F V S Y S T F P G F
V S W R D P K S G S W Y V E T L D D I F E Q W A H S E D L Q
S L L L R V A N A V S V K G I Y K Q M P G C F N F L R K K L F
F K T S

SEQ ID NO: 10, secuencia de nucleótidos enlazadora (entre Caspasa-9 y 2A)
GCTAGCAGA

SEQ ID NO: 11, secuencia de aminoácidos enlazadora (entre Caspasa-9 y 2A)
ASR

SEQ ID NO: 12, Secuencia de nucleótidos de precursor de proteína de la cápside de virus 2A de Thosea asigna

GCCGAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATCCCG
GGCCC

SEQ ID NO: 13, Secuencia de aminoácidos de precursor de proteína de la cápside de virus 2A de Thosea asigna
A E G R G S L L T C G D V E E N P G P

SEQ ID NO: 14, secuencia de nucleótidos de CD19 humano (Δ dominio citoplasmático) (dominio transmembrana en negrita)

ATGCCACCTCCTCGCCTCCTCTTCTTCCTCCTCTTCCTCACCCCCATGGAAGTC
AGGCCCGAGGAACCTCTAGTGGTGAAGGTGGAAGAGGGAGATAACGCTGTGCT
GCAGTGCCTCAAGGGGACCTCAGATGGCCCCACTCAGCAGCTGACCTGGTCTC
GGGAGTCCCCGCTTAAACCCTTCTTAAAACTCAGCCTGGGGCTGCCAGGCCTG
GGAATCCACATGAGGCCCCTGGCCATCTGGCTTTTCATCTTCAACGTCTCTCAA
CAGATGGGGGGCTTCTACCTGTGCCAGCCGGGGCCCCCCTCTGAGAAGGCCT
GGCAGCCTGGCTGGACAGTCAATGTGGAGGGCAGCGGGGAGCTGTTCCGGTG
GAATGTTTCGGACCTAGGTGGCCTGGGCTGTGGCCTGAAGAACAGGTCCTCAG
AGGGCCCCAGCTCCCCTTCCGGGAAGCTCATGAGCCCCAAGCTGTATGTGTGG
GCCAAAGACCGCCCTGAGATCTGGGAGGGAGAGCCTCCGTGTCTCCCACCGA
GGGACAGCCTGAACCAGAGCCTCAGCCAGGACCTCACCATGGCCCCTGGCTC
CACACTCTGGCTGTCCTGTGGGGTACCCCCTGACTCTGTGTCCAGGGGCCCCC
TCTCCTGGACCCATGTGCACCCCAAGGGGCCTAAGTCATTGCTGAGCCTAGAG
CTGAAGGACGATCGCCCGGCCAGAGATATGTGGGTAATGGAGACGGGTCTGTT
GTTGCCCCGGGCCACAGCTCAAGACGCTGGAAAGTATTATTGTCACCGTGGCA
ACCTGACCATGTCATTCCACCTGGAGATCACTGCTCGGCCAGTACTATGGCACT
GGCTGCTGAGGACTGGTGGCTGGAAG**GTCTCAGCTGTGACTTTGGCTTATCTG**
ATCTTCTGCCTGTGTTCCCTTGTGGGCATTCTTCATCTTCAAAGAGCCCTGGTC
CTGAGGAGGAAAAGAAAGCGAATGACTGACCCCACCAGGAGATTC

SEQ ID NO: 15, secuencia de aminoácidos de CD19 humano (Δ domino citoplasmático)

M P P P R L L F F L L F L T P M E V R P E E P L V V K V E E G
D N A V L Q C L K G T S D G P T Q Q L T W S R E S P L K P F L
K L S L G L P G L G I H M R P L A I W L F I F N V S Q Q M G G

F Y L C Q P G P P S E K A W Q P G W T V N V E G S G E L F R
W N V S D L G G L G C G L K N R S S E G P S S P S G K L M S
P K L Y V W A K D R P E I W E G E P P C L P P R D S L N Q S L
S Q D L T M A P G S T L W L S C G V P P D S V S R G P L S W
T H V H P K G P K S L L S L E L K D D R P A R D M W V M E T
G L L L P R A T A Q D A G K Y Y C H R G N L T M S F H L E I T
A R P V L W H W L L R T G G W K V S A V T L A Y L I F C L C S
L V G I L H L Q R A L V L R R K R K R M T D P T R R F

SEQ ID NO: 16, secuencia de nucleótidos de 3’LTR

TGAAAGACCCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGCA
AGGCATGGAAAAATACATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTCAGGAA
CAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCT
GCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGG
ATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCC
CCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGG
GTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTT
CGCTTCTCGCTTCTGTTCGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCC
ACAACCCCTCACTCGGGGCGCCAGTCCTCCGATTGACTGAGTCGCCCGGGTAC
CCGTGTATCCAATAAACCCTCTTGCAGTTGCATCCGACTTGTGGTCTCGCTGTT
CCTTGGGAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCA

SEQ ID NO: 17, Secuencia de nucleótidos de construcción de vector de expresión-secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica y las secuencias 5' y 3' LTR y secuencia de vector adicional.

TGAAAGACCCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGCA
AGGCATGGAAAAATACATAACTGAGAATAGAAAAGTTCAGATCAAGGTCAGGAA
CAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCT
GCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGG
ATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCC
CCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGG
GTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTT
CGCTTCTCGCTTCTGTTCGCGCGCTTATGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCC
ACAACCCCTCACTCGGGGCGCCAGTCCTCCGATTGACTGAGTCGCCCGGGTAC
CCGTGTATCCAATAAACCCTCTTGCAGTTGCATCCGACTTGTGGTCTCGCTGTT

CCTTGGGAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCA
TTTGGGGGCTCGTCCGGGATCGGGAGACCCCTGCCCAGGGACCACCGACCCA
CCACCGGGAGGTAAGCTGGCCAGCAACTTATCTGTGTCTGTCCGATTGTCTAGT
GTCTATGACTGATTTTATGCGCCTGCGTCGGTACTAGTTAGCTAACTAGCTCTGT
ATCTGGCGGACCCGTGGTGGAACTGACGAGTTCGGAACACCCGGCCGCAACC
CTGGGAGACGTCCCAGGGACTTCGGGGGCCGTTTTTGTGGCCCGACCTGAGTC
CTAAAATCCCGATCGTTTAGGACTCTTTGGTGCACCCCCCTTAGAGGAGGGATA
TGTGGTTCTGGTAGGAGACGAGAACCTAAAACAGTTCCCGCCTCCGTCTGAATT
TTTGCTTTCGGTTTGGGACCGAAGCCGCGCCGCGCGTCTTGTCTGCTGCAGCA
TCGTTCTGTGTTGTCTCTGTCTGACTGTGTTTCTGTATTTGTCTGAAAATATGGG
CCCGGGCTAGCCTGTTACCACTCCCTTAAGTTTGACCTTAGGTCACTGGAAAGA
TGTCGAGCGGATCGCTCACAACCAGTCGGTAGATGTCAAGAAGAGACGTTGGG
TTACCTTCTGCTCTGCAGAATGGCCAACCTTTAACGTCGGATGGCCGCGAGACG
GCACCTTTAACCGAGACCTCATCACCCAGGTTAAGATCAAGGTCTTTTCACCTG
GCCCGCATGGACACCCAGACCAGGTGGGGTACATCGTGACCTGGGAAGCCTT
GGCTTTTGACCCCCCTCCCTGGGTCAAGCCCTTTGTACACCCTAAGCCTCCGCC
TCCTCTTCCTCCATCCGCCCCGTCTCTCCCCCTTGAACCTCCTCGTTCGACCCC
GCCTCGATCCTCCCTTTATCCAGCCCTCACTCCTTCTCTAGGCGCCCCCATATG
GCCATATGAGATCTTATATGGGGCACCCCCGCCCCTTGTAAACTTCCCTGACCC
TGACATGACAAGAGTTACTAACAGCCCCTCTCTCCAAGCTCACTTACAGGCTCT
CTACTTAGTCCAGCACGAAGTCTGGAGACCTCTGGCGGCAGCCTACCAAGAAC
AACTGGACCGACCGGTGGTACCTCACCCTTACCGAGTCGGCGACACAGTGTGG
GTCCGCCGACACCAGACTAAGAACCTAGAACCTCGCTGGAAAGGACCTTACAC
AGTCCTGCTGACCACCCCCACCGCCCTCAAAGTAGACGGCATCGCAGCTTGGA
TACACGCCGCCCACGTGAAGGCTGCCGACCCCGGGGGTGGACCATCCTCTAG
ACTGCCATGCTCGAGGGAGTGCAGGTGGAAACCATCTCCCCAGGAGACGGGC
GCACCTTCCCCAAGCGCGGCCAGACCTGCGTGGTGCACTACACCGGGATGCTT
GAAGATGGAAAGAAAGTTGATTCCTCCCGGGACAGAAACAAGCCCTTTAAGTTT
ATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCGAGGCTGGGAAGAAGGGGTTGCCCAGA
TGAGTGTGGGTCAGAGAGCCAAACTGACTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTG
CCACTGGGCACCCAGGCATCATCCCACCACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTG
GAGCTTCTAAAACTGGAATCTGGCGGTGGATCCGGAGTCGACGGATTTGGTGA
TGTCGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTTACATCCTGAG
CATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGTGA
GTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGC
GTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCC
AAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCAGCAGGACCACGGTGCTCT

GGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGC
AGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAG
ATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAA
GCTCTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTGAGG
TGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGAT
GCCACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTGGACGCCATATC
TAGTTTGCCCACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTTTCCCAGGTTTT
GTTTCCTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGACGA
CATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGT
CGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAAT
TTCCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAGCCGAGGGCAGG
GGAAGTCTTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATCCCGGGCCCATGCCACC
TCCTCGCCTCCTCTTCTTCCTCCTCTTCCTCACCCCCATGGAAGTCAGGCCCGA
GGAACCTCTAGTGGTGAAGGTGGAAGAGGGAGATAACGCTGTGCTGCAGTGCC
TCAAGGGGACCTCAGATGGCCCCACTCAGCAGCTGACCTGGTCTCGGGAGTCC
CCGCTTAAACCCTTCTTAAAACTCAGCCTGGGGCTGCCAGGCCTGGGAATCCA
CATGAGGCCCCTGGCCATCTGGCTTTTCATCTTCAACGTCTCTCAACAGATGGG
GGGCTTCTACCTGTGCCAGCCGGGGCCCCCCTCTGAGAAGGCCTGGCAGCCT
GGCTGGACAGTCAATGTGGAGGGCAGCGGGGAGCTGTTCCGGTGGAATGTTTC
GGACCTAGGTGGCCTGGGCTGTGGCCTGAAGAACAGGTCCTCAGAGGGCCCC
AGCTCCCCTTCCGGGAAGCTCATGAGCCCCAAGCTGTATGTGTGGGCCAAAGA
CCGCCCTGAGATCTGGGAGGGAGAGCCTCCGTGTCTCCCACCGAGGGACAGC
CTGAACCAGAGCCTCAGCCAGGACCTCACCATGGCCCCTGGCTCCACACTCTG
GCTGTCCTGTGGGGTACCCCCTGACTCTGTGTCCAGGGGCCCCCTCTCCTGGA
CCCATGTGCACCCCAAGGGGCCTAAGTCATTGCTGAGCCTAGAGCTGAAGGAC
GATCGCCCGGCCAGAGATATGTGGGTAATGGAGACGGGTCTGTTGTTGCCCCG
GGCCACAGCTCAAGACGCTGGAAAGTATTATTGTCACCGTGGCAACCTGACCAT
GTCATTCCACCTGGAGATCACTGCTCGGCCAGTACTATGGCACTGGCTGCTGA
GGACTGGTGGCTGGAAGGTCTCAGCTGTGACTTTGGCTTATCTGATCTTCTGCC
TGTGTTCCCTTGTGGGCATTCTTCATCTTCAAAGAGCCCTGGTCCTGAGGAGGA
AAAGAAAGCGAATGACTGACCCCACCAGGAGATTCTAACGCGTCATCATCGATC
CGGATTAGTCCAATTTGTTAAAGACAGGATATCAGTGGTCCAGGCTCTAGTTTTG
ACTCAACAATATCACCAGCTGAAGCCTATAGAGTACGAGCCATAGATAAAATAAA
AGATTTTATTTAGTCTCCAGAAAAAGGGGGGAATGAAAGACCCCACCTGTAGGT
TTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGCAAGGCATGGAAAAATACATAACT
GAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTCAGGAACAGATGGAACAGCTGAATATGG
GCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAA

CAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCT
GCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCAGCCCTCA
GCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATG
ACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTCGCGC
GCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCACAACCCCTCACTCGGGGCGC
CAGTCCTCCGATTGACTGAGTCGCCCGGGTACCCGTGTATCCAATAAACCCTCT
TGCAGTTGCATCCGACTTGTGGTCTCGCTGTTCCTTGGGAGGGTCTCCTCTGAG
TGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCACACATGCAGCATGTATCAAAATT
AATTTGGTTTTTTTTCTTAAGTATTTACATTAAATGGCCATAGTACTTAAAGTTACA
TTGGCTTCCTTGAAATAAACATGGAGTATTCAGAATGTGTCATAAATATTTCTAAT
TTTAAGATAGTATCTCCATTGGCTTTCTACTTTTTCTTTTATTTTTTTTTGTCCTCT
GTCTTCCATTTGTTGTTGTTGTTTGTTTGTTTGTTTGTTGGTTGGTTGGTTAA
TTTTTTTTTAAAGATCCTACACTATAGTTCAAGCTAGACTATTAGCTACTCTGTAA
CCCAGGGTGACCTTGAAGTCATGGGTAGCCTGCTGTTTTAGCCTTCCCACATCT
AAGATTACAGGTATGAGCTATCATTTTTGGTATATTGATTGATTGATTGATTGATG
TGTGTGTGTGTGATTGTGTTTGTGTGTGTGACTGTGAAAATGTGTGTATGGGTG
TGTGTGAATGTGTGTATGTATGTGTGTGTGTGAGTGTGTGTGTGTGTGTGTGCA
TGTGTGTGTGTGTGACTGTGTCTATGTGTATGACTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG
TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTTGTGAAAAAATATTCTATGGTAGTGAGA
GCCAACGCTCCGGCTCAGGTGTCAGGTTGGTTTTTGAGACAGAGTCTTTCACTT
AGCTTGGAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGG
CGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAA
TAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATG
GCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCAC
ACCGCATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCC
AGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCT
CCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTC
AGAGGTTTTCACCGTCATCACCGAAACGCGCGATGACGAAAGGGCCTCGTGAT
ACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGT
GGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATAC
ATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATAT
TGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTT
TTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAA
AGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAA
CAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAG
CACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCA
AGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTC

ACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAG
TGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGAT
CGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAA
CTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAG
CGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACT
GGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCG
GATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATT
GCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACT
GGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTC
AGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGA
TTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTA
AAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCAT
GACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGA
AAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTG
CAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTA
CCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACT
GTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCG
CCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGAT
AAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCA
GCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACG
ACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTT
CCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAG
GAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCT
GTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGG
GGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGC
CTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTG
GATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAAC
GACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGC
AAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAG
GTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGC
TCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTG
TGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTA
CGCCAAGCTTTGCTCTTAGGAGTTTCCTAATACATCCCAAACTCAAATATATAAA
GCATTTGACTTGTTCTATGCCCTAGGGGGCGGGGGGAAGCTAAGCCAGCTTTTT
TTAACATTTAAAATGTTAATTCCATTTTAAATGCACAGATGTTTTTATTTCATAAGG
GTTTCAATGTGCATGAATGCTGCAATATTCCTGTTACCAAAGCTAGTATAAATAA
AAATAGATAAACGTGGAAATTACTTAGAGTTTCTGTCATTAACGTTTCCTTCCTCA

GTTGACAACATAAATGCGCTGCTGAGCAAGCCAGTTTGCATCTGTCAGGATCAA
TTTCCCATTATGCCAGTCATATTAATTACTAGTCAATTAGTTGATTTTTATTTTTGA
CATATACATGTGAA

SEQ ID NO: 18, (secuencia de nucleótidos de $F_{V'}F_{Vls}$ con enlazadores Xhol/Sall, (codones desordenados en minúscula en $F_{V'}$))

ctcgagGGcGTcCAaGTcGAaACcATtagtCCcGGcGAtGGcaGaACaTTtCCtAAaaGgGG
aCAaACaTGtGTcGTcCAtTAtACaGGcATGtTgGAgGAcGGcAAaAAgGTgGAcagtagta
GaGAtcGcAAtAAaCCtTTcAAaTTcATGtTgGGaAAaCAaGAaGTcATtaGgGGaTGGG
AgGAgGGcGTgGCtCAaATGtccGTcGGcCAacGcGCtAAgCTcACcATcagcCCcGAcT
AcGCaTAcGGcGCtACcGGaCAtCCcGGaATtATtCCcCCtCAcGCtACctTgGTgTTtGAc
GTcGAaCTgtTgAAgCTcGAagtcgagggagtgcaggtggaaaccatctccccaggagacgggcgcacct
tccccaagcgcggccagacctgcgtggtgcactacaccgggatgcttgaagatggaaagaaagttgattcctcccgg
gacagaaacaagccctttaagtttatgctaggcaagcaggaggtgatccgaggctgggaagaaggggttgcccag
atgagtgtgggtcagagagccaaactgactatatctccagattatgcctatggtgccactgggcacccaggcatcatcc
caccacatgccactctcgtcttcgatgtggagcttctaaaactggaatctggcggtggatccggagtcgag

SEQ ID NO: 19, (secuencia de aminoácidos de $F_{V'}F_{VLS}$)

GlyValGlnValGluThrIleSerProGlyAspGlyArgThrPheProLysArgGlyGlnThrCysValValHi
sTyrThrGlyMetLeuGluAspGlyLysLysValAspSerSerArgAspArgAsnLysProPheLysPhe
MetLeuGlyLysGlnGluValIleArgGlyTrpGluGluGlyValAlaGlnMetSerValGlyGlnArgAlaLy
sLeuThrIleSerProAspTyrAlaTyrGlyAlaThrGlyHisProGlyIleIleProProHisAlaThrLeuValP
heAspValGluLeuLeuLysLeuGlu (ValGlu)

GlyValGlnValGluThrIleSerProGlyAspGlyArgThrPheProLysArgGlyGlnThrCysValValHi
sTyrThrGlyMetLeuGluAspGlyLysLysValAspSerSerArgAspArgAsnLysProPheLysPhe
MetLeuGlyLysGlnGluValIleArgGlyTrpGluGluGlyValAlaGlnMetSerValGlyGlnArgAlaLy
sLeuThrIleSerProAspTyrAlaTyrGlyAlaThrGlyHisProGlyIleIleProProHisAlaThrLeuValP
heAspValGluLeuLeuLysLeuGlu-SerGlyGlyGlySerGly

SEQ ID NO: 20, FKBP12v36 (res. 2-108)
enlazador SGGGSG (6 aa)
ΔCasp9 (res. 135-416)

ATGCTCGAGGGAGTGCAGGTGGAgACtATCTCCCCAGGAGACGGGCGCACCTT
CCCCAAGCGCGGCCAGACCTGCGTGGTGCACTACACCGGGATGCTTGAAGATG

GAAAGAAAGTTGATTCCTCCCGGGACAGAAACAAGCCCTTTAAGTTTATGCTAG
GCAAGCAGGAGGTGATCCGAGGCTGGGAAGAAGGGGTTGCCCAGATGAGTGT
GGGTCAGAGAGCCAAACTGACTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGG
GCACCCAGGCATCATCCCACCACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCT
AAAACTGGAA**TCTGGCGGTGGATCCGG**AGTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTG
CTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGC
CCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGTGAGTCCGGGC
TCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTTC
TCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAAAT
GGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCgGCAGGACCACGGTGCTCTGGACTGCT
GCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCA
GGGGCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAA
CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTT
TCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCTCC
ACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCC
GTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCC
CACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGG
AGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGA
GCAGTGGGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATG
CTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAATTTCCTCCG
GAAAAAACTTTTCTTTAAAACATCA

SEQ ID NO: 21, FKBP12v36 (res. 2-108)

G V Q V E T I S P G D G R T F P K R G Q T C V V H Y T G M L
E D G K K V D S S R D R N K P F K F M L G K Q E V I R G W E
E G V A Q M S V G Q R A K L T I S P D Y A Y G A T G H P G I I
P P H A T L V F D V E L L K L E

SEQ ID NO: 22, ΔCasp9 (res. 135-416)

G F G D V G A L E S L R G N A D L A Y I L S M E P C G H C L I
I N N V N F C R E S G L R T R T G S N I D C E K L R R R F S S
L H F M V E V K G D L T A K K M V L A L L E L A R Q D H G A L
D C C V V V I L S H G C Q A S H L Q F P G A V Y G T D G C P V
S V E K I V N I F N G T S C P S L G G K P K L F F I Q A C G G
E Q K D H G F E V A S T S P E D E S P G S N P E P D A T P F
Q E G L R T F D Q L D A I S S L P T P S D I F V S Y S T F P G F
V S W R D P K S G S W Y V E T L D D I F E Q W A H S E D L Q
S L L L R V A N A V S V K G I Y K Q M P G C F N F L R K K L F
F K T S

SEQ ID NO: 23, ΔCasp9 (res. 135-416) D330A, secuencia de nucleótidos

GGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCT
TACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAAC
TTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGA
GAAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCG
ACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCgGCAGGAC
CACGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCTGTCAGGC
CAGCCACCTGCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGT
CGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGA
GGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCA
TGGGTTTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACC
CCGAGCCAGATGCCACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTG

GCCGCCATATCTAGTTTGCCCACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT
TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAG
ACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCT
CCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAGATGCC
TGGTTGCTTTAATTTCCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAAACATCA

SEQ ID NO: 24, ΔCasp9 (res. 135-416) D330A, secuencia de aminoácidos

G F G D V G A L E S L R G N A D L A Y I L S M E P C G H C L I
I N N V N F C R E S G L R T R T G S N I D C E K L R R R F S S
L H F M V E V K G D L T A K K M V L A L L E L A R Q D H G A L
D C C V V V I L S H G C Q A S H L Q F P G A V Y G T D G C P V
S V E K I V N I F N G T S C P S L G G K P K L F F I Q A C G G
E Q K D H G F E V A S T S P E D E S P G S N P E P D A T P F
Q E G L R T F D Q L A A I S S L P T P S D I F V S Y S T F P G F
V S W R D P K S G S W Y V E T L D D I F E Q W A H S E D L Q
S L L L R V A N A V S V K G I Y K Q M P G C F N F L R K K L F
F K T S

SEQ ID NO: 25, ΔCasp9 (res. 135-416) N405Q, secuencia de nucleótidos

GGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCT
TACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAAC
TTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGA
GAAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCG
ACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCgGCAGGAC
CACGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCTGTCAGGC
CAGCCACCTGCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGT
CGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGA
GGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCA
TGGGTTTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACC
CCGAGCCAGATGCCACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTG
GACGCCATATCTAGTTTGCCCACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT
TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAG
ACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCT
CCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAGATGCC
TGGTTGCTTTCAGTTCCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAAACATCA

SEQ ID NO: 26, ΔCasp9 (res. 135-416) N405Q, secuencia de aminoácidos

G F G D V G A L E S L R G N A D L A Y I L S M E P C G H C L I
I N N V N F C R E S G L R T R T G S N I D C E K L R R R F S S
L H F M V E V K G D L T A K K M V L A L L E L A R Q D H G A L
D C C V V V I L S H G C Q A S H L Q F P G A V Y G T D G C P V
S V E K I V N I F N G T S C P S L G G K P K L F F I Q A C G G
E Q K D H G F E V A S T S P E D E S P G S N P E P D A T P F
Q E G L R T F D Q L D A I S S L P T P S D I F V S Y S T F P G F
V S W R D P K S G S W Y V E T L D D I F E Q W A H S E D L Q
S L L L R V A N A V S V K G I Y K Q M P G C F Q F L R K K L F
F K T S

SEQ ID NO: 27, ΔCasp9 (res. 135-416) D330A N405Q, secuencia de nucleótidos

GGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCT
TACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAAC

TTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGA
GAAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCG
ACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCgGCAGGAC
CACGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCTGTCAGGC
CAGCCACCTGCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGT
CGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGA
GGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCA
TGGGTTTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACC
CCGAGCCAGATGCCACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTG
GCCGCCATATCTAGTTTGCCCACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT
TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAG
ACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCT
CCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAGATGCC
TGGTTGCTTTCAGTTCCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAAACATCA

SEQ ID NO: 28, ΔCasp9 (res. 135-416) D330A N405Q, secuencia de aminoácidos

G F G D V G A L E S L R G N A D L A Y I L S M E P C G H C L I
I N N V N F C R E S G L R T R T G S N I D C E K L R R R F S S
L H F M V E V K G D L T A K K M V L A L L E L A R Q D H G A L
D C C V V V I L S H G C Q A S H L Q F P G A V Y G T D G C P V
S V E K I V N I F N G T S C P S L G G K P K L F F I Q A C G G
E Q K D H G F E V A S T S P E D E S P G S N P E P D A T P F
Q E G L R T F D Q L A A I S S L P T P S D I F V S Y S T F P G F
V S W R D P K S G S W Y V E T L D D I F E Q W A H S E D L Q
S L L L R V A N A V S V K G I Y K Q M P G C F Q F L R K K L F
F K T S

SEQ ID NO: 29, FKBPv36 (Fv1), secuencia de nucleótidos

GGCGTTCAAGTAGAAACAATCAGCCCAGGAGACGGAAGGACTTTCCCCAAACG
AGGCCAAACATGCGTAGTTCATTATACTGGGATGCTCGAAGATGGAAAAAAAGT
AGATAGTAGTAGAGACCGAAACAAACCATTTAAATTTATGTTGGGAAAACAAGAA
GTAATAAGGGGCTGGGAAGAAGGTGTAGCACAAATGTCTGTTGGCCAGCGCGC
AAAACTCACAATTTCTCCTGATTATGCTTACGGAGCTACCGGCCACCCCGGCAT
CATACCCCCTCATGCCACACTGGTGTTTGACGTCGAATTGCTCAAACTGGAA

SEQ ID NO: 30, FKBPv36 (Fv1), secuencia de aminoácidos

GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKPFKFMLGKQEV
IRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE

SEQ ID NO: 31, FKBPv36 (Fv2), secuencia de nucleótidos

GGaGTgCAgGTgGAgACgATtAGtCCtGGgGAtGGgAGaACcTTtCCaAAgCGcGGtCA
gACcTGtGTtGTcCAcTAcACcGGtATGCTgGAgGAcGGgAAgAAgGTgGActcTtcacGc
GAtCGcAAtAAgCCtTTcAAgTTcATGcTcGGcAAgCAgGAgGTgATccGGGGgTGGGA
gGAgGGcGTgGCtCAgATGTCgGTcGGgCAaCGaGCgAAgCTtACcATcTCaCCcGAc
TAcGCgTAtGGgGCaACgGGgCAtCCgGGaATtATcCCtCCcCAcGCtACgCTcGTaTTc
GAtGTgGAgcTcttgAAgCTtGag

SEQ ID NO: 32, FKBPv36 (Fv2), secuencia de aminoácidos

GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKPFKFMLGKQEV

IRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE

SEQ ID NO: 33, ΔCD19, secuencia de nucleótidos

ATGCCCCCTCCTAGACTGCTGTTTTTCCTGCTCTTTCTCACCCCAATGGAAGTTA
GACCTGAGGAACCACTGGTCGTTAAAGTGGAAGAAGGTGATAATGCTGTCCTCC
AATGCCTTAAAGGGACCAGCGACGGACCAACGCAGCAACTGACTTGGAGCCGG
GAGTCCCCTCTCAAGCCGTTTCTCAAGCTGTCACTTGGCCTGCCAGGTCTTGGT
ATTCACATGCGCCCCCTTGCCATTTGGCTCTTCATATTCAATGTGTCTCAACAAA
TGGGTGGATTCTACCTTTGCCAGCCCGGCCCCCCTTCTGAGAAAGCTTGGCAG
CCTGGATGGACCGTCAATGTTGAAGGCTCCGGTGAGCTGTTTAGATGGAATGT
GAGCGACCTTGGCGGACTCGGTTGCGGACTGAAAAATAGGAGCTCTGAAGGAC
CCTCTTCTCCCTCCGGTAAGTTGATGTCACCTAAGCTGTACGTGTGGGCCAAGG
ACCGCCCCGAAATCTGGGAGGGCGAGCCTCCATGCCTGCCGCCTCGCGATTCA
CTGAACCAGTCTCTGTCCCAGGATCTCACTATGGCGCCCGGATCTACTCTTTGG
CTGTCTTGCGGCGTTCCCCCAGATAGCGTGTCAAGAGGACCTCTGAGCTGGAC
CCACGTACACCCTAAGGGCCCTAAGAGCTTGTTGAGCCTGGAACTGAAGGACG
ACAGACCCGCACGCGATATGTGGGTAATGGAGACCGGCCTTCTGCTCCCTCGC
GCTACCGCACAGGATGCAGGGAAATACTACTGTCATAGAGGGAATCTGACTATG
AGCTTTCATCTCGAAATTACAGCACGGCCCGTTCTTTGGCATTGGCTCCTCCGG
ACTGGAGGCTGGAAGGTGTCTGCCGTAACACTCGCTTACTTGATTTTTTGCCTG
TGTAGCCTGGTTGGGATCCTGCATCTTCAGCGAGCCCTTGTATTGCGCCGAAAA
AGAAAACGAATGACTGACCCTACACGACGATTCTGA

SEQ ID NO: 34, ΔCD19, secuencia de aminoácidos

MPPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRES
PLKPFLKLSLGLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWT
VNVEGSGELFRWNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEI
WEGEPPCLPPRDSLNQSLSQDLTMAPGSTLWLSCGVPPDSVSRGPLSWTHVHPK
GPKSLLSLELKDDRPARDMWVMETGLLLPRATAQDAGKYYCHRGNLTMSFHLEITA
RPVLWHWLLRTGGWKVSAVTLAYLIFCLCSLVGILHLQRALVLRRKRKRMTDPTRR
F*

Secuencia de iCasp9-N405Q-2A-ΔCD19 con codones optimizados: (el .co después del nombre de una secuencia de nucleótidos indica que tiene codones optimizados (o la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos con codones optimizados)).

SEQ ID NO: 35, FKBPv36.co (Fv3), secuencia de nucleótidos

ATGCTGGAGGGAGTGCAGGTGGAGACTATTAGCCCCGGAGATGGCAGAACATT
CCCCAAAAGAGGACAGACTTGCGTCGTGCATTATACTGGAATGCTGGAAGACG
GCAAGAAGGTGGACAGCAGCCGGGACCGAAACAAGCCCTTCAAGTTCATGCTG
GGGAAGCAGGAAGTGATCCGGGGCTGGGAGGAAGGAGTCGCACAGATGTCAG
TGGGACAGAGGGCCAAACTGACTATTAGCCCAGACTACGCTTATGGAGCAACC
GGCCACCCCGGGATCATTCCCCCTCATGCTACACTGGTCTTCGATGTGGAGCT
GCTGAAGCTGGAA

SEQ ID NO: 36, FKBPv36.co (Fv3), secuencia de aminoácidos

MLEGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKPFKFMLGK
QEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE

SEQ ID NO: 37, Linker.co, secuencia de nucleótidos
AGCGGAGGAGGATCCGGA

SEQ ID NO: 38, Linker.co, secuencia de aminoácidos
SGGGSG

SEQ ID NO: 39, Caspase-9.co, secuencia de nucleótidos

GTGGACGGGTTTGGAGATGTGGGAGCCCTGGAATCCCTGCGGGGCAATGCCG
ATCTGGCTTACATCCTGTCTATGGAGCCTTGCGGCCACTGTCTGATCATTAACA
ATGTGAACTTCTGCAGAGAGAGCGGGCTGCGGACCAGAACAGGATCCAATATT
GACTGTGAAAAGCTGCGGAGAAGGTTCTCTAGTCTGCACTTTATGGTCGAGGTG
AAAGGCGATCTGACCGCTAAGAAAATGGTGCTGGCCCTGCTGGAACTGGCTCG
GCAGGACCATGGGGCACTGGATTGCTGCGTGGTCGTGATCCTGAGTCACGGCT
GCCAGGCTTCACATCTGCAGTTCCCTGGGGCAGTCTATGGAACTGACGGCTGT
CCAGTCAGCGTGGAGAAGATCGTGAACATCTTCAACGGCACCTCTTGCCCAAGT
CTGGGCGGGAAGCCCAAACTGTTCTTTATTCAGGCCTGTGGAGGCGAGCAGAA
AGATCACGGCTTCGAAGTGGCTAGCACCTCCCCCGAGGACGAATCACCTGGAA
GCAACCCTGAGCCAGATGCAACCCCCTTCCAGGAAGGCCTGAGGACATTTGAC
CAGCTGGATGCCATCTCAAGCCTGCCCACACCTTCTGACATTTTCGTCTCTTAC
AGTACTTTCCCTGGATTTGTGAGCTGGCGCGATCCAAAGTCAGGCAGCTGGTAC
GTGGAGACACTGGACGATATCTTTGAGCAGTGGGCCCATTCTGAAGACCTGCA
GAGTCTGCTGCTGCGAGTGGCCAATGCTGTCTCTGTGAAGGGGATCTACAAAC
AGATGCCAGGATGCTTCCAGTTTCTGAGAAAGAAACTGTTCTTTAAGACCTCCG
CATCTAGGGCC

SEQ ID NO: 40, Caspase-9.co, secuencia de aminoácidos

VDGFGDVGALESLRGNADLAYILSMEPCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEK
LRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELARQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQ
FPGAVYGTDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVAST
SPEDESPGSNPEPDATPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPK
SGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFQFLRKKLFFK
TSASRA

SEQ ID NO: 41, Linker.co, secuencia de nucleótidos
CCGCGG

SEQ ID NO: 42, Linker.co, secuencia de aminoácidos
PR

SEQ ID NO: 42: T2A.co, secuencia de nucleótidos

GAAGGCCGAGGGAGCCTGCTGACATGTGGCGATGTGGAGGAAAACCCAGGAC
CA

SEQ ID NO: 43: T2A.co, secuencia de aminoácidos
EGRGSLLTCGDVEENPGP

SEQ ID NO: 43: Δ CD19.co, secuencia de nucleótidos

ATGCCACCACCTCGCCTGCTGTTCTTTCTGCTGTTCCTGACACCTATGGAGGTG
CGACCTGAGGAACCACTGGTCGTGAAGGTCGAGGAAGGCGACAATGCCGTGCT

GCAGTGCCTGAAAGGCACTTCTGATGGGCCAACTCAGCAGCTGACCTGGTCCA
GGGAGTCTCCCCTGAAGCCTTTTCTGAAACTGAGCCTGGGACTGCCAGGACTG
GGAATCCACATGCGCCCTCTGGCTATCTGGCTGTTCATCTTCAACGTGAGCCAG
CAGATGGGAGGATTCTACCTGTGCCAGCCAGGACCACCATCCGAGAAGGCCTG
GCAGCCTGGATGGACCGTCAACGTGGAGGGGTCTGGAGAACTGTTTAGGTGGA
ATGTGAGTGACCTGGGAGGACTGGGATGTGGGCTGAAGAACCGCTCCTCTGAA
GGCCCAAGTTCACCCTCAGGGAAGCTGATGAGCCCAAAACTGTACGTGTGGGC
CAAAGATCGGCCCGAGATCTGGGAGGGAGAACCTCCATGCCTGCCACCTAGAG
ACAGCCTGAATCAGAGTCTGTCACAGGATCTGACAATGGCCCCCGGGTCCACT
CTGTGGCTGTCTTGTGGAGTCCCACCCGACAGCGTGTCCAGAGGCCCTCTGTC
CTGGACCCACGTGCATCCTAAGGGGCCAAAAAGTCTGCTGTCACTGGAACTGA
AGGACGATCGGCCTGCCAGAGACATGTGGGTCATGGAGACTGGACTGCTGCTG
CCACGAGCAACCGCACAGGATGCTGGAAAATACTATTGCCACCGGGGCAATCT
GACAATGTCCTTCCATCTGGAGATCACTGCAAGGCCCGTGCTGTGGCACTGGC
TGCTGCGAACCGGAGGATGGAAGGTCAGTGCTGTGACACTGGCATATCTGATC
TTTTGCCTGTGCTCCCTGGTGGGCATTCTGCATCTGCAGAGAGCCCTGGTGCT
GCGGAGAAAGAGAAAGAGAATGACTGACCCAACAAGAAGGTTTTGA

SEQ ID NO: 43: Δ CD19.co, secuencia de aminoácidos

MPPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRES
PLKPFLKLSLGLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWT
VNVEGSGELFRWNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEI
WEGEPPCLPPRDSLNQSLSQDLTMAPGSTLWLSCGVPPDSVSRGPLSWTHVHPK
GPKSLLSLELKDDRPARDMWVMETGLLLPRATAQDAGKYYCHRGNLTMSFHLEITA
RPVLWHWLLRTGGWKVSAVTLAYLIFCLCSLVGILHLQRALVLRRKRKRMTDPTRR
F*

Tabla 6: Ejemplos adicionales de variantes de Caspasa-9

Variantes de iCasp9	Secuencia de ADN	Secuencia de aminoácidos
Fv-L-Caspasa9 TS-2A	**SEQ ID NO: 44** (Fv)ATGCTCGAGGGAGTGCAGGTGGAgACtA TCTCCCCAGGAGACGGGCGCACCTTCCCCAA GCGCGGCCAGACCTGCGTGGTGCACTACAC CGGGATGCTTGAAGATGGAAAGAAAGTTGA TTCCTCCCGGGACAGAAACAAGCCCTTTAAG TTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCGA GGCTGGGAAGAAGGGGTTGCCCAGATGAG TGTGGGTCAGAGAGCCAAACTGACTATATCT CCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACC CAGGCATCATCCCACCACATGCCACTCTCGT CTTCGATGTGGAGCTTCTAAAACTGGA- (linker)TCTGGCGGTGGATCCGGA- (iCasp9)GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGT GCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGAT TTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTG GCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAACTT CTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACT GGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTTGCGG CGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTCATGGTGG AGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAAA TGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGC AGGACCACGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGG TGGTCATTCTCTCTCACGGCTGTCAGGCCAG CCACCTGCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGC ACAGATGGATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAG ATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCC CCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTT CATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGA CCATGGGTTTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCT GAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAG CCAGATGCCACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGA GGACCTTCGACCAGCTGGACGCCATATCTAG TTTGCCCACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCT ACTCTACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGG GACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAG ACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTC ACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAG GGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATT TATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAATTTCCT CCGGAAAAAACTTTTCTTTAAAACATCAGCT AGCAGAGCC- (T2A)GAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATG CGGGGACGTGGAGGAAAATCCCGGGCCC	**SEQ ID NO: 45** (Fv)MLEGVQVETISPGDGRTFPKRGQ TCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKP FKFMLGKQEVIR GWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAY GATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE- (linker)SGGGSG-(iCasp9)VDGF GDVGALESLRGNADLAYILSMEPCGH CLIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKL RRRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQF PGAVYGTDGC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFI QACGGEQKDHGFEVASTSPEDESPG SNPEPDA TPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPG CFNFLRKKLFFKTSASRA- EGRGSLLTCGDVEENP GP-

(continuación)

Variantes de iCasp9	Secuencia de ADN	Secuencia de aminoácidos
Fv=L=iCaspasa9 TS con codones optimizados-T2A con codones optimizados	**SEQ ID NO: 46** (Fv)- GGAGTGCAGGTGGAGACTATTAGCCCCGGA GATGGCAGAACATTCCCCAAAAGAGGACAG ACTTGCGTCGTGCATTATACTGGAATGCTGG AAGACGGCAAGAAGGTGGACAGCAGCCGG GACCGAAACAAGCCCTTCAAGTTCATGCTGG GGAAGCAGGAAGTGATCCGGGGCTGGGAG GAAGGAGTCGCACAGATGTCAGTGGGACAG AGGGCCAAACTGACTATTAGCCCAGACTAC GCTTATGGAGCAACCGGCCACCCCGGGATC ATTCCCCCTCATGCTACACTGGTCTTCGATGT GGAGCTGCTGAAGCTGGAA-(L)- AGCGGAGGAGGATCCGGA-(iCasp9)- GTGGACGGGTTTGGAGATGTGGGAGCCCTG GAATCCCTGCGGGGCAATGCCGATCTGGCTT ACATCCTGTCTATGGAGCCTTGCGGCCACTG TCTGATCATTAACAATGTGAACTTCTGCAGA GAGAGCGGGCTGCGGACCAGAACAGGATC CAATATTGACTGTGAAAAGCTGCGGAGAAG GTTCTCTAGTCTGCACTTTATGGTCGAGGTG AAAGGCGATCTGACCGCTAAGAAAATGGTG CTGGCCCTGCTGGAACTGGCTCGGCAGGAC CATGGGGCACTGGATTGCTGCGTGGTCGTG ATCCTGAGTCACGGCTGCCAGGCTTCACATC TGCAGTTCCCTGGGGCAGTCTATGGAACTGA CGGCTGTCCAGTCAGCGTGGAGAAGATCGT GAACATCTTCAACGGCACCTCTTGCCCAAGT CTGGGCGGGAAGCCCAAACTGTTCTTTATTC AGGCCTGTGGAGGCGAGCAGAAAGATCAC GGCTTCGAAGTGGCTAGCACCTCCCCCGAG GACGAATCACCTGGAAGCAACCCTGAGCCA GATGCAACCCCCTTCCAGGAAGGCCTGAGG ACATTTGACCAGCTGGATGCCATCTCAAGCC TGCCCACACCTTCTGACATTTTCGTCTCTTAC AGTACTTTCCCTGGATTTGTGAGCTGGCGCG ATCCAAAGTCAGGCAGCTGGTACGTGGAGA CACTGGACGATATCTTTGAGCAGTGGGCCCA TTCTGAAGACCTGCAGAGTCTGCTGCTGCGA GTGGCCAATGCTGTCTCTGTGAAGGGGATCT ACAAACAGATGCCAGGATGCTTCAACTTTCT GAGAAAGAAACTGTTCTTTAAGACCTCCGCA TCTAGGGCC-(T2A)- CCGCGGGAAGGCCGAGGGAGCCTGCTGAC ATGTGGCGATGTGGAGGAAAACCCAGGACC A	**SEQ ID NO: 47** (Fv-L)- VDGFGDVGALESLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQF PGAVYGTDGC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFI QACGGEQKDHGFEVASTSPEDESPG SNPEPDA TPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPG CFNFLRKKLFFKTSASRA- EGRGSLLTCGDVEENP GP-(T2A)

FviCASP9 **S144A**-T2A	**SEQ ID NO: 48** (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AG**gc**TTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTTA CATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGC CTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGTG AGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAA CATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTTC TCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAGG GCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGG CTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACG GTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCT CTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAG TTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGA TGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAAC ATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGG GAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGC CTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTT TGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG TCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCA CCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGA CCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCACA CCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTTT CCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAAG AGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGAC GACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAG ACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAA TGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAG ATGCCTGGTTGCTTTAATTTCCTCCGGAAAA AACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAGC C-(T2A)	**SEQ ID NO: 49** (Fv-L)- VDGFGDVGALE**a**LRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTDGCPVSVEKI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGE QKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDA TPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI YKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA
Fv-iCASP9 **S144D**-T2A	**SEQ ID NO: 50** (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AG**gac**TTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTTA CATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGC CTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGTG AGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAA CATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTTC TCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAGG GCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGG CTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACG GTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCT CTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAG TTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGA TGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAAC ATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGG GAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGC CTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTT	**SEQ ID NO: 51** (Fv-L)- VDGFGDVGALE**d**LRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTDGCPVSVEKI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGE QKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDA TPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI YKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA

	TGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG TCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCA CCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGA CCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCACA CCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTTT CCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAAG AGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGAC GACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAG ACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAA TGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAG ATGCCTGGTTGCTTTAATTTCCTCCGGAAAA AACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAGC C-(T2A)	
Fv-iCASP9 **S183A**-T2A	**SEQ ID NO: 52** (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGC**gCC**A ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCCTCCGGAAA AAACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)	**SEQ ID NO: 53** (Fv-L)- VDGFGDVGALESLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTG**a**NI DCEKLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTDGCPVSVEKI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGE QKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDA TPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI YKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)

Fv-iCASP9 **S196A**-T2A	**SEQ ID NO: 54** (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCC**gCG**CTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCCTCCGGAAA AAACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)	**SEQ ID NO: 55** (Fv-L)- VDGFGDVGALESLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFS**a**LHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTDGCPVSVEKI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGE QKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDA TPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI YKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA- (T2A)
Fv-iCASP9 **S196D**-T2A	**SEQ ID NO: 56** (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCC**gac**CTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT	**SEQ ID NO: 57** (Fv-L)- VDGFGDVGALESLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFS**d**LHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTDGCPVSVEKI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGE QKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDA TPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI YKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA- (T2A)

	TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCCTCCGGAAA AAACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)	
Fv-iCASP9 **C285A**-T2A	**SEQ ID NO: 58** (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGG CC**gcg**GGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCCTCCGGAAA AAACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)	**SEQ ID NO: 59** (Fv-L)- VDGFGDVGALESLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTDGCPVSVEKI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQA**a**GGE QKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDA TPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI YKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA- (T2A)

Fv-iCASP9 **A316G**-T2A	**SEQ ID NO: 60** (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGAT**GgC** ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCCTCCGGAAA AAACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)	**SEQ ID NO: 61** (Fv-L)- VDGFGDVGALESLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTDGCPVSVEKI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGE QKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPD**g** TPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI YKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA- (T2A)
Fv-iCASP9 **T317A**-T2A	**SEQ ID NO: 62** (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT	**SEQ ID NO: 63** (Fv-L)- VDGFGDVGALESLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQF PGAVYGTDGC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFI QACGGEQKDHGFEVASTSPEDESPG SNPEPDA **a**PFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPG CFNFLRKKLFFKTSASRA -(T2A)

	TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC **gCC**CCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCCTCCGGAAA AAACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)	
Fv-iCASP9 **T317C**-T2A	**SEQ ID NO: 64** (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC **tgC**CCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCCTCCGGAAA AAACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)	**SEQ ID NO: 65** (Fv-L)- VDGFGDVGALESLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQF PGAVYGTDGC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFI QACGGEQKDHGFEVASTSPEDESPG SNPEPDA **c**PFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPG CFNFLRKKLFFKTSASRA -(T2A)

Fv-iCASP9 **T317S**-T2A	**SEQ ID NO: 66** (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC **tCC**CCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCCTCCGGAAA AAACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)	**SEQ ID NO: 67** (Fv-L)- VDGFGDVGALESLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQF PGAVYGTDGC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFI QACGGEQKDHGFEVASTSPEDESPG SNPEPDA **s**PFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPG CFNFLRKKLFFKTSASRA -(T2A)
Fv-iCASP9 **F326K**-T2A	**SEQ ID NO: 68** (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT	**SEQ ID NO: 69** (Fv-L)- VDGFGDVGALESLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTDGCPVSVEKI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGE QKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDA TPFQEGLRT**k**DQLDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI YKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA

	TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACC**aag**G ACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCCTCCGGAAA AAACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAG CC	
Fv-iCASP9 **D327K**-T2A	**SEQ ID NO: 70** (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTC**a** **Ag**CAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCCTCCGGAAA AAACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)	**SEQ ID NO: 71** (Fv-L)- VDGFGDVGALESLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTDGCPVSVEKI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGE QKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDA TPFQEGLRTF**k**QLDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI YKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA- (T2A)

Fv-iCASP9 **D327R**-T2A	**SEQ ID NO: 72** GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTC**a** **gg**CAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCCTCCGGAAA AAACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)	**SEQ ID NO: 73** (Fv-L)- VDGFGDVGALESLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTDGCPVSVEKI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGE QKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDA TPFQEGLRTF**r**QLDAISSLPTPSDIFVSY STFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDIF EQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIY KQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA- (T2A)
Fv-iCASP9 **D327G**-T2A	**SEQ ID NO: 74** GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC	**SEQ ID NO: 75** (Fv-L)- VDGFGDVGALESLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTDGCPVSVEKI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGE QKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDA TPFQEGLRTF**g**QLDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI YKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA- (T2A)

	ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTC**G** **gC**CAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCCTCCGGAAA AAACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)	
Fv-iCASP9 **Q328K**-T2A	**SEQ ID NO: 76** (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG AC**aAG**CTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCCTCCGGAAA AAACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)	**SEQ ID NO: 77** VDGFGDVGALESLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTDGCPVSVEKI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGE QKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDA TPFQEGLRTFD**k**LDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI YKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA- (T2A)

Fv-iCASP9 **Q328R**-T2A	**SEQ ID NO: 78** (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG AC**agG**CTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCCTCCGGAAA AAACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)	**SEQ ID NO: 79** (Fv-L)- VDGFGDVGALESLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTDGCPVSVEKI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGE QKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDA TPFQEGLRTFD**r**LDAISSLPTPSDIFVSY STFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDIF EQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIY KQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA- (T2A)
Fv-iCASP9 **L329K**-T2A	**SEQ ID NO: 80** (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT	**SEQ ID NO: 81** (Fv-L)- VDGFGDVGALESLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTDGCPVSVEKI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGE QKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDA TPFQEGLRTFDQ**k**DAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI YKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA

	TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACCAG**aaGG**ACGCCATATCTAGTTTGCCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCCTCCGGAAA AAACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAG CC	
Fv-iCASP9 **L329E**-T2A	**SEQ ID NO: 82** (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACCAG**gaG**GACGCCATATCTAGTTTGCCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCCTCCGGAAA AAACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)	**SEQ ID NO: 83** (Fv-L)- VDGFGDVGALESLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTDGCPVSVEKI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGE QKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDA TPFQEGLRTFDQ**e**DAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI YKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA- (T2A)

Fv-iCASP9 **L329G**-T2A	**SEQ ID NO: 84** GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACCAG**ggc**GACGCCATATCTAGTTTGCCCACA CCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTTT CCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAAG AGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGAC GACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAG ACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAA TGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAG ATGCCTGGTTGCTTTAATTTCCTCCGGAAAA AACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAGC C	**SEQ ID NO: 85** VDGFGDVGALESLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTDGCPVSVEKI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGE QKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDA TPFQEGLRTFDQ**g**DAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI YKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA
Fv-L-Caspase9 **D330A**-T2A	**SEQ ID NO: 86** (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA	**SEQ ID NO: 87** (Fv-L)- VDGFGDVGALESLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQF PGAVYGTDGC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFI QACGGEQKDHGFEVASTSPEDESPG SNPEPDA TPFQEGLRTFDQL**a**AISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPG CFNFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)

	GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTG**GcC**GCCATATCTAGTTTGCCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCCTCCGGAAA AAACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)	
Fv-L-Caspase9 **D330E**-T2A	**SEQ ID NO: 88** (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTG**GcC**GCCATATCTAGTTTGCCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCCTCCGGAAA AAACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)	**SEQ ID NO: 89** (Fv-L)- VDGFGDVGALESLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQF PGAVYGTDGC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFI QACGGEQKDHGFEVASTSPEDESPG SNPEPDA TPFQEGLRTFDQL**e**AISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPG CFNFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)

Fv-L-Caspase9 **D330N**-T2A	**SEQ ID NO: 90** (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTG**GcC**GCCATATCTAGTTTGCCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCCTCCGGAAA AAACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)	**SEQ ID NO: 91** (Fv-L)- VDGFGDVGALESLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQF PGAVYGTDGC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFI QACGGEQKDHGFEVASTSPEDESPG SNPEPDA TPFQEGLRTFDQL**n**AISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPG CFNFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)
Fv-L-Caspase9 **D330V**-T2A	**SEQ ID NO: 92** (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT	**SEQ ID NO: 93** (Fv-L)- VDGFGDVGALESLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQF PGAVYGTDGC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFI QACGGEQKDHGFEVASTSPEDESPG SNPEPDA TPFQEGLRTFDQL**v**AISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPG CFNFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)

	TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTG**GcC**GCCATATCTAGTTTGCCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCCTCCGGAAA AAACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)	
Fv-L-Caspase9 **D330G**-T2A	**SEQ ID NO: 94** (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTG**GcC**GCCATATCTAGTTTGCCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCCTCCGGAAA AAACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)	**SEQ ID NO: 95** (Fv-L)- VDGFGDVGALESLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQF PGAVYGTDGC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFI QACGGEQKDHGFEVASTSPEDESPG SNPEPDA TPFQEGLRTFDQL**g**AISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPG CFNFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)

Fv-L-Caspase9 **D330S**-T2A	**SEQ ID NO: 96** (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTG**GcC**GCCATATCTAGTTTGCCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCCTCCGGAAA AAACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)	**SEQ ID NO: 97** (Fv-L)- VDGFGDVGALESLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQF PGAVYGTDGC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFI QACGGEQKDHGFEVASTSPEDESPG SNPEPDA TPFQEGLRTFDQL**s**AISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPG CFNFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)
Fv-iCASP9 **A331K**-T2A	**SEQ ID NO: 98** (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT	**SEQ ID NO: 99** (Fv-L)- VDGFGDVGALESLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTDGCPVSVEKI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGE QKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDA TPFQEGLRTFDQLD**k**ISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI YKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA- (T2A)

	TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTGGAC**aag**ATATCTAGTTTGCCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCCTCCGGAAA AAACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)	
Fv-L-iCaspase9 **F404Y**-T2A	**SEQ ID NO: 100** (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACA GATGCCTGGTTGC**TaT**AATTTCCTCCGGAAA AAACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)	**SEQ ID NO: 101** (Fv-L)- VDGFGDVGALESLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQF PGAVYGTDGC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFI QACGGEQKDHGFEVASTSPEDESPG SNPEPDA TPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPG C**y**NFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)

Fv-L-iCASP9 **F404W**-T2A	**SEQ ID NO: 102** (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACA GATGCCTGGTTGC**Tgg**AATTTCCTCCGGAAA AAACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)	**SEQ ID NO: 103** (Fv-L)- VDGFGDVGALESLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQF PGAVYGTDGC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFI QACGGEQKDHGFEVASTSPEDESPG SNPEPDA TPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPG C**w**NFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)
Fv-L-iCaspase9 **N405Q**-T2A	**SEQ ID NO: 104** (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT	**SEQ ID NO: 105** (Fv-L)- VDGFGDVGALESLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQF PGAVYGTDGC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFI QACGGEQKDHGFEVASTSPEDESPG SNPEPDA TPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPG CF**q**FLRKKLFFKTSASRA-(T2A)

	TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACA GATGCCTGGTTGCTTT**cag**TTCCTCCGGAAAA AACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAGC C-(T2A)	
Fv-L-iCaspasa9 **N405Q** con codones optimizados-T2A	**SEQ ID NO: 106** -(Fv-L)- GTGGACGGGTTTGGAGATGTGGGAGCCCTG GAATCCCTGCGGGGCAATGCCGATCTGGCTT ACATCCTGTCTATGGAGCCTTGCGGCCACTG TCTGATCATTAACAATGTGAACTTCTGCAGA GAGAGCGGGCTGCGGACCAGAACAGGATC CAATATTGACTGTGAAAAGCTGCGGAGAAG GTTCTCTAGTCTGCACTTTATGGTCGAGGTG AAAGGCGATCTGACCGCTAAGAAAATGGTG CTGGCCCTGCTGGAACTGGCTCGGCAGGAC CATGGGGCACTGGATTGCTGCGTGGTCGTG ATCCTGAGTCACGGCTGCCAGGCTTCACATC TGCAGTTCCCTGGGGCAGTCTATGGAACTGA CGGCTGTCCAGTCAGCGTGGAGAAGATCGT GAACATCTTCAACGGCACCTCTTGCCCAAGT CTGGGCGGGAAGCCCAAACTGTTCTTTATTC AGGCCTGTGGAGGCGAGCAGAAAGATCAC GGCTTCGAAGTGGCTAGCACCTCCCCCGAG GACGAATCACCTGGAAGCAACCCTGAGCCA GATGCAACCCCCTTCCAGGAAGGCCTGAGG ACATTTGACCAGCTGGATGCCATCTCAAGCC TGCCCACACCTTCTGACATTTTCGTCTCTTAC AGTACTTTCCCTGGATTTGTGAGCTGGCGCG ATCCAAAGTCAGGCAGCTGGTACGTGGAGA CACTGGACGATATCTTTGAGCAGTGGGCCCA TTCTGAAGACCTGCAGAGTCTGCTGCTGCGA GTGGCCAATGCTGTCTCTGTGAAGGGGATCT ACAAACAGATGCCAGGATGCTT**Ccag**TTTCT GAGAAAGAAACTGTTCTTTAAGACCTCCGCA TCTAGGGCC-(T2A)	**SEQ ID NO: 107** (Fv-L)- VDGFGDVGALESLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQF PGAVYGTDGC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFI QACGGEQKDHGFEVASTSPEDESPG SNPEPDA TPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPG CF**q**FLRKKLFFKTSASRA-(T2A)

Fv-iCASP9 **F406L**-T2A	**SEQ ID NO: 108** (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACA GATGCCTGGTTGCTTTAAT**cTC**CTCCGGAAA AAACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)	**SEQ ID NO: 109** (Fv-L)- VDGFGDVGALESLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTDGCPVSVEKI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGE QKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDA TPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI YKQMPGCFNLLRKKLFFKTSASRA- (T2A)
Fv-iCASP9 **F406T**-T2A	**SEQ ID NO: 110** (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT	**SEQ ID NO: 111** (Fv-L)- VDGFGDVGALESLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTDGCPVSVEKI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGE QKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDA TPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI YKQMPGCFN**t**LRKKLFFKTSASRA- (T2A)

	TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACA GATGCCTGGTTGCTTTAA**ttc**CCTCCGGAAAA AACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAGC C-(T2A)	
Fv-L-iCaspasa9 **S144A N405Q**-T2A con codones optimizados	**SEQ ID NO: 112** (Fv-L)- GTGGACGGGTTTGGAGATGTGGGAGCCCTG GAA**gCC**CTGCGGGGCAATGCCGATCTGGCTT ACATCCTGTCTATGGAGCCTTGCGGCCACTG TCTGATCATTAACAATGTGAACTTCTGCAGA GAGAGCGGGCTGCGGACCAGAACAGGATC CAATATTGACTGTGAAAAGCTGCGGAGAAG GTTCTCTAGTCTGCACTTTATGGTCGAGGTG AAAGGCGATCTGACCGCTAAGAAAATGGTG CTGGCCCTGCTGGAACTGGCTCGGCAGGAC CATGGGGCACTGGATTGCTGCGTGGTCGTG ATCCTGAGTCACGGCTGCCAGGCTTCACATC TGCAGTTCCCTGGGGCAGTCTATGGAACTGA CGGCTGTCCAGTCAGCGTGGAGAAGATCGT GAACATCTTCAACGGCACCTCTTGCCCAAGT CTGGGCGGGAAGCCCAAACTGTTCTTTATTC AGGCCTGTGGAGGCGAGCAGAAAGATCAC GGCTTCGAAGTGGCTAGCACCTCCCCCGAG GACGAATCACCTGGAAGCAACCCTGAGCCA GATGCAACCCCCTTCCAGGAAGGCCTGAGG ACATTTGACCAGCTGGATGCCATCTCAAGCC TGCCCACACCTTCTGACATTTTCGTCTCTTAC AGTACTTTCCCTGGATTTGTGAGCTGGCGCG ATCCAAAGTCAGGCAGCTGGTACGTGGAGA CACTGGACGATATCTTTGAGCAGTGGGCCCA TTCTGAAGACCTGCAGAGTCTGCTGCTGCGA GTGGCCAATGCTGTCTCTGTGAAGGGGATCT ACAAACAGATGCCAGGATGCTTC**cag**TTTCT GAGAAAGAAACTGTTCTTTAAGACCTCCGCA TCTAGGGCC-(T2A)	**SEQ ID NO: 113** (Fv-L)- VDGFGDVGALE**a**LRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQF PGAVYGTDGC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFI QACGGEQKDHGFEVASTSPEDESPG SNPEPDA TPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPG CF**q**FLRKKLFFKTSASRA-(T2A)

Fv-iCASP9 **S144A D330A**-T2A	**SEQ ID NO: 114** (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AG**gcTT**TGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTTA CATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGC CTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGTG AGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAA CATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTTC TCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAGG GCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGG CTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACG GTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCT CTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAG TTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGA TGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAAC ATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGG GAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGC CTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTT TGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG TCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCA CCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGA CCAGCTG**GcC**GCCATATCTAGTTTGCCCACA CCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTTT CCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAAG AGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGAC GACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAG ACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAA TGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAG ATGCCTGGTTGCTTTAATTTCCTCCGGAAAA AACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAGC C-(T2A)	**SEQ ID NO: 115** (Fv-L)- VDGFGDVGALE**a**LRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTDGCPVSVEKI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGE QKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDA TPFQEGLRTFDQL**a**AISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI YKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA
Fv-iCASP9 **S144D D330A**-T2A	**SEQ ID NO: 116** (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AG**gac**TTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTTA CATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGC CTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGTG AGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAA CATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTTC TCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAGG GCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGG CTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACG GTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCT CTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAG TTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGA TGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAAC ATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGG GAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGC CTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTT	**SEQ ID NO: 117** (Fv-L)- VDGFGDVGALE**d**LRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTDGCPVSVEKI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGE QKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDA TPFQEGLRTFDQL**a**AISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI YKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA

	TGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG TCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCA CCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGA CCAGCTG**GcC**GCCATATCTAGTTTGCCCACA CCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTTT CCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAAG AGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGAC GACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAG ACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAA TGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAG ATGCCTGGTTGCTTTAATTTCCTCCGGAAAA AACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAGC C-(T2A)	
Fv-iCASP9 **S196A D330A**-T2A	**SEQ ID NO: 118** (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCC**gCG**CTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTG**GcC**GCCATATCTAGTTTGCCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCCTCCGGAAA AAACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)	**SEQ ID NO: 119** (Fv-L)- VDGFGDVGALESLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFS**aL**HFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTDGCPVSVEKI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGE QKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDA TPFQEGLRTFDQL**a**AISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI YKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA- (T2A)

Fv-iCASP9 **S196D D330A**-T2A	**SEQ ID NO: 120** (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCC**gac**CTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTG**GcC**GCCATATCTAGTTTGCCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCCTCCGGAAA AAACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)	**SEQ ID NO: 121** (Fv-L)- VDGFGDVGALESLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFS**d**LHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTDGCPVSVEKI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGE QKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDA TPFQEGLRTFDQL**a**AISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI YKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA- (T2A)
Fv-L-iCaspasa9 **T317S N405Q**-T2A con codones optimizados	**SEQ ID NO: 122** (Fv-L)- GTGGACGGGTTTGGAGATGTGGGAGCCCTG GAATCCCTGCGGGGCAATGCCGATCTGGCTT ACATCCTGTCTATGGAGCCTTGCGGCCACTG TCTGATCATTAACAATGTGAACTTCTGCAGA GAGAGCGGGCTGCGGACCAGAACAGGATC CAATATTGACTGTGAAAAGCTGCGGAGAAG GTTCTCTAGTCTGCACTTTATGGTCGAGGTG AAAGGCGATCTGACCGCTAAGAAAATGGTG CTGGCCCTGCTGGAACTGGCTCGGCAGGAC CATGGGGCACTGGATTGCTGCGTGGTCGTG ATCCTGAGTCACGGCTGCCAGGCTTCACATC TGCAGTTCCCTGGGGCAGTCTATGGAACTGA CGGCTGTCCAGTCAGCGTGGAGAAGATCGT GAACATCTTCAACGGCACCTCTTGCCCAAGT CTGGGCGGGAAGCCCAAACTGTTCTTTATTC AGGCCTGTGGAGGCGAGCAGAAAGATCAC	**SEQ ID NO: 123** (Fv-L)- VDGFGDVGALESLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQF PGAVYGTDGC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFI QACGGEQKDHGFEVASTSPEDESPG SNPEPDA **s**PFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPG CF**q**FLRKKLFFKTSASRA-(T2A)

	GGCTTCGAAGTGGCTAGCACCTCCCCCGAG GACGAATCACCTGGAAGCAACCCTGAGCCA GATGCA**AgC**CCCTTCCAGGAAGGCCTGAGG ACATTTGACCAGCTGGATGCCATCTCAAGCC TGCCCACACCTTCTGACATTTTCGTCTCTTAC AGTACTTTCCCTGGATTTGTGAGCTGGCGCG ATCCAAAGTCAGGCAGCTGGTACGTGGAGA CACTGGACGATATCTTTGAGCAGTGGGCCCA TTCTGAAGACCTGCAGAGTCTGCTGCTGCGA GTGGCCAATGCTGTCTCTGTGAAGGGGATCT ACAAACAGATGCCAGGATGCTT**Ccag**TTTCT GAGAAAGAAACTGTTCTTTAAGACCTCCGCA TCTAGGGCC-(T2A)	
Fv-L-Caspasa9 **D330A N405Q**-T2A	**SEQ ID NO: 124** (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTG**GcC**GCCATATCTAGTTTGCCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACA GATGCCTGGTTGCTT**cag**TTTCCTCCGGAAAA AACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAGC C-(T2A)	**SEQ ID NO: 125** (Fv-L)- VDGFGDVGALESLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQF PGAVYGTDGC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFI QACGGEQKDHGFEVASTSPEDESPG SNPEPDA TPFQEGLRTFDQL**a**AISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPG CF**q**FLRKKLFFKTSASRA-(T2A)

Fv-iCASP9 **ATPF316AVPI**-T2A	**SEQ ID NO: 126** (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGA**TGCC** **gtgCCcaTC**CAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGA CCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCACA CCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTTT CCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAAG AGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGAC GACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAG ACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAA TGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAG ATGCCTGGTTGCTTTAATTTCCTCCGGAAAA AACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAGC C-(T2A)	**SEQ ID NO: 127** (Fv-L)- VDGFGDVGALESLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTDGCPVSVEKI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGE QKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPD**A** **vPi**QEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI YKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA- (T2A)
Fv-iCASP9 **isaqt**-T2A	**SEQ ID NO: 128** (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT	**SEQ ID NO: 129** (Fv-L)- VDGFGDVGALESLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQF PGAVYGTDGC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFI QACGGEQKDHGFEVASTSPEDESPG SNPEPDA TPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMP**is** **aqt**LRKKLFFKTSASRA-(T2A)

	TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACA GATGCC**gatatccgcacagaca**CTCCGGAAAAAA CTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAGCC- (T2A)	

Secuencia parcial de un inserto de plásmido que codifica un polipéptido de Caspasa-9 inducible y un receptor de antígeno quimérico que se une a CD19, separado por un enlazador 2A, en donde los dos polipéptidos de Caspasa-9 y el receptor de antígeno quimérico están separados durante la traducción. El ejemplo de un receptor de antígeno quimérico proporcionado en el presente documento puede modificarse adicionalmente incluyendo polipéptidos coestimuladores, tales como, por ejemplo, pero sin limitación, CD28, 4-1BB y OX40. El polipéptido de Caspasa-9 inducible proporcionado en el presente documento puede sustituirse por un polipéptido de Caspasa-9 inducible, tal como, por ejemplo, los proporcionados en el presente documento.

SEQ ID NO: 130 FKBPv36

ATGCTGGAGGGAGTGCAGGTGGAGACTATTAGCCCCGGAGATGGCAGAACATT
CCCCAAAAGAGGACAGACTTGCGTCGTGCATTATACTGGAATGCTGGAAGACG
GCAAGAAGGTGGACAGCAGCCGGGACCGAAACAAGCCCTTCAAGTTCATGCTG
GGGAAGCAGGAAGTGATCCGGGGCTGGGAGGAAGGAGTCGCACAGATGTCAG
TGGGACAGAGGGCCAAACTGACTATTAGCCCAGACTACGCTTATGGAGCAACC
GGCCACCCCGGGATCATTCCCCCTCATGCTACACTGGTCTTCGATGTGGAGCT
GCTGAAGCTGGAA

SEQ ID NO: 131 FKBPv36

MLEGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKPFKFMLGK
QEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE

SEQ ID NO: 132 Enlazador
AGCGGAGGAGGATCCGGA

SEQ ID NO: 133 Enlazador
SGGGSG

SEQ ID NO: 134 Caspasa-9

GTGGACGGGTTTGGAGATGTGGGAGCCCTGGAATCCCTGCGGGGCAATGCCG
ATCTGGCTTACATCCTGTCTATGGAGCCTTGCGGCCACTGTCTGATCATTAACA
ATGTGAACTTCTGCAGAGAGAGCGGGCTGCGGACCAGAACAGGATCCAATATT
GACTGTGAAAAGCTGCGGAGAAGGTTCTCTAGTCTGCACTTTATGGTCGAGGTG
AAAGGCGATCTGACCGCTAAGAAAATGGTGCTGGCCCTGCTGGAACTGGCTCG
GCAGGACCATGGGGCACTGGATTGCTGCGTGGTCGTGATCCTGAGTCACGGCT
GCCAGGCTTCACATCTGCAGTTCCCTGGGGCAGTCTATGGAACTGACGGCTGT
CCAGTCAGCGTGGAGAAGATCGTGAACATCTTCAACGGCACCTCTTGCCCAAGT
CTGGGCGGGAAGCCCAAACTGTTCTTTATTCAGGCCTGTGGAGGCGAGCAGAA
AGATCACGGCTTCGAAGTGGCTAGCACCTCCCCCGAGGACGAATCACCTGGAA
GCAACCCTGAGCCAGATGCAACCCCCTTCCAGGAAGGCCTGAGGACATTTGAC
CAGCTGGATGCCATCTCAAGCCTGCCCACACCTTCTGACATTTTCGTCTCTTAC
AGTACTTTCCCTGGATTTGTGAGCTGGCGCGATCCAAAGTCAGGCAGCTGGTAC
GTGGAGACACTGGACGATATCTTTGAGCAGTGGGCCCATTCTGAAGACCTGCA
GAGTCTGCTGCTGCGAGTGGCCAATGCTGTCTCTGTGAAGGGGATCTACAAAC
AGATGCCAGGATGCTTCAACTTTCTGAGAAAGAAACTGTTCTTTAAGACCTCCG
CATCTAGGGCC

SEQ ID NO: 135 Caspasa-9

VDGFGDVGALESLRGNADLAYILSMEPCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEK
LRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELARQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQ
FPGAVYGTDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVAST
SPEDESPGSNPEPDATPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPK
SGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKLFFK
TSASRA

SEQ ID NO: 136 Enlazador
CCGCGG

SEQ ID NO: 137 Enlazador
PR

SEQ ID NO: 138 T2A

GAAGGCCGAGGGAGCCTGCTGACATGTGGCGATGTGGAGGAAAACCCAGGAC
CA

SEQ ID NO: 139 T2A
EGRGSLLTCGDVEENPGP

SEQ ID NO: 140 Enlazador
CCATGG

SEQ ID NO: 141 Enlazador
PW
SEQ ID NO: 142 Péptido de señal

ATGGAGTTTGGACTTTCTTGGTTGTTTTTGGTGGCAATTCTGAAGGGTGTCCAGT
GTAGCAGG

SEQ ID NO: 143 Péptido de señal
MEFGLSWLFLVAILKGVQCSR

SEQ ID NO: 144 Cadena ligera variable de FMC63 (anti-CD19)

GACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGA
GTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAATTGGTATC
AGCAGAAACCAGATGGAACTGTTAAACTCCTGATCTACCATACATCAAGATTACA
CTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCT
CACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGG
TAATACGCTTCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACTAAGTTGGAAATAACA

SEQ ID NO: 145 Cadena ligera variable de FMC63 (anti CD19)

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSG
VPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIT

SEQ ID NO: 146 Enlazador flexible
GGCGGAGGAAGCGGAGGTGGGGGC

SEQ ID NO: 147 Enlazador flexible
GGGSGGGG

SEQ ID NO: 148 Cadena pesada variable de FMC63 (anti-CD19)

GAGGTGAAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCC
TGTCCGTCACATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAGCT
GGATTCGCCAGCCTCCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGT
AGTGAAACCACATACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGACCATCATCAAGG
ACAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACTGATGACAC
AGCCATTTACTACTGTGCCAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGAC
TACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 149 Cadena pesada variable de FMC63 (anti CD19)

EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSE
TTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWG
QGTSVTVSS

SEQ ID NO: 150 Enlazador
GGATCC

SEQ ID NO: 151 Enlazador
GS

SEQ ID NO: 152 Epítopo mínimo de CD34
GAACTTCCTACTCAGGGGACTTTCTCAAACGTTAGCACAAACGTAAGT

SEQ ID NO: 153 Epítopo mínimo de CD34
ELPTQGTFSNVSTNVS

SEQ ID NO: 154 dominio de tallo de CD8 α

CCCGCCCCAAGACCCCCCACACCTGCGCCGACCATTGCTTCTCAACCCCTGAG
TTTGAGACCCGAGGCCTGCCGGCCAGCTGCCGGCGGGGCCGTGCATACAAGA
GGACTCGATTTCGCTTGCGAC

SEQ ID NO: 155 dominio de tallo de CD8 α
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD

SEQ ID NO: 156 dominio transmembrana de CD8 α

ATCTATATCTGGGCACCTCTCGCTGGCACCTGTGGAGTCCTTCTGCTCAGCCTG
GTTATTACTCTGTACTGTAATCACCGGAATCGCCGCCGCGTTTGTAAGTGTCCC
AGG

SEQ ID NO: 157 dominio transmembrana de CD8 α
IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPR

SEQ ID NO: 158 Enlazador
GTCGAC

SEQ ID NO: 159 Enlazador
VD

SEQ ID NO: 160 CD3 zeta

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGA
ACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGG
ACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAA
CCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCT
ACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGG
CCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACAT
GCAGGCCCTGCCCCCTCGC

SEQ ID NO: 161 CD3 zeta

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP
QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL
PPR

A continuación, se proporciona un ejemplo de un inserto de plásmido que codifica un receptor de antígeno quimérico que se une a Her2/Neu. El receptor de antígeno quimérico puede modificarse incluyendo polipéptidos coestimuladores, tales como, por ejemplo, pero sin limitación, CD28, OX40 y 4-1BB.

SEQ ID NO: 162 Péptido de señal

ATGGAGTTTGGACTTTCTTGGTTGTTTTTGGTGGCAATTCTGAAGGGTGTCCAGT
GTAGCAGG

SEQ ID NO: 163 Péptido de señal
MEFGLSWLFLVAILKGVQCSR

SEQ ID NO: 164 Cadena ligera variable de FRP5 (anti-Her2)

GACATCCAATTGACACAATCACACAAATTTCTCTCAACTTCTGTAGGAGACAGAG
TGAGCATAACCTGCAAAGCATCCCAGGACGTGTACAATGCTGTGGCTTGGTACC
AACAGAAGCCTGGACAATCCCCAAAATTGCTGATTTATTCTGCCTCTAGTAGGTA
CACTGGGGTACCTTCTCGGTTTACGGGCTCTGGGTCCGGACCAGATTTCACGTT
CACAATCAGTTCCGTTCAAGCTGAAGACCTCGCTGTTTATTTTTGCCAGCAGCA
CTTCCGAACCCCTTTTACTTTTGGCTCAGGCACTAAGTTGGAAATCAAGGCTTTG

SEQ ID NO: 165 Cadena ligera variable de FRP5 (anti-Her2)

DIQLTQSHKFLSTSVGDRVSITCKASQDVYNAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASSRYT
GVPSRFTGSGSGPDFTFTISSVQAEDLAVYFCQQHFRTPFTFGSGTKLEIKAL

SEQ ID NO: 166 Enlazador flexible
GGCGGAGGAAGCGGAGGTGGGGGC

SEQ ID NO: 167 Enlazador flexible
GGGSGGGG

SEQ ID NO: 168 Cadena pesada variable de FRP5 (anti-Her2/Neu)

GAAGTCCAATTGCAACAGTCAGGCCCCGAATTGAAAAAGCCCGGCGAAACAGT
GAAGATATCTTGTAAAGCCTCCGGTTACCCTTTTACGAACTATGGAATGAACTGG
GTCAAACAAGCCCCTGGACAGGGATTGAAGTGGATGGGATGGATCAATACATC
AACAGGCGAGTCTACCTTCGCAGATGATTTCAAAGGTCGCTTTGACTTCTCACT
GGAGACCAGTGCAAATACCGCCTACCTTCAGATTAACAATCTTAAAAGCGAGGA
TATGGCAACCTACTTTTGCGCAAGATGGGAAGTTTATCACGGGTACGTGCCATA
CTGGGGACAAGGAACGACAGTGACAGTTAGTAGC

SEQ ID NO: 169 Cadena pesada variable de FRP5 (anti-Her2/Neu)

EVQLQQSGPELKKPGETVKISCKASGYPFTNYGMNWVKQAPGQGLKWMGWINTS
TGESTFADDFKGRFDFSLETSANTAYLQINNLKSEDMATYFCARWEVYHGYVPYW
GQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 170 Enlazador
GGATCC

SEQ ID NO: 171 Enlazador
GS

SEQ ID NO: 172 Epítopo mínimo de CD34

GAACTTCCTACTCAGGGGACTTTCTCAAACGTTAGCACAAACGTAAGT

SEQ ID NO: 173 Epítopo mínimo de CD34
ELPTQGTFSNVSTNVS

SEQ ID NO: 174 tallo de CD8 alfa

CCCGCCCCAAGACCCCCCACACCTGCGCCGACCATTGCTTCTCAACCCCTGAG
TTTGAGACCCGAGGCCTGCCGGCCAGCTGCCGGCGGGGCCGTGCATACAAGA
GGACTCGATTTCGCTTGCGAC

SEQ ID NO: 175 tallo de CD8 alfa
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD

SEQ ID NO: 176 Región transmembrana de CD8 alfa

ATCTATATCTGGGCACCTCTCGCTGGCACCTGTGGAGTCCTTCTGCTCAGCCTG
GTTATTACTCTGTACTGTAATCACCGGAATCGCCGCCGCGTTTGTAAGTGTCCC
AGG

SEQ ID NO: 177 Región transmembrana de CD8 alfa
IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPR

SEQ ID NO: 178 Enlazador
Ctcgag

SEQ ID NO: 179 Enlazador
LE

SEQ ID NO: 180 Dominio citoplasmático de CD3 zeta

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGA
ACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGG
ACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAA
CCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCT
ACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGG

CCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACAT
GCAGGCCCTGCCCCCTCGC

SEQ ID NO: 181 Dominio citoplasmático de CD3 zeta

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP
QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL
PPR

Secuencias adicionales

SEQ ID NO: 182, CD28 nt

TTCTGGGTACTGGTTGTAGTCGGTGGCGTACTTGCTTGTTATTCTCTTCTTGTTA
CCGTAGCCTTCATTATATTCTGGGTCCGATCAAAGCGCTCAAGACTCCTCCATT
CCGATTATATGAACATGACACCTCGCCGACCTGGTCCTACACGCAAACATTATC
AACCCTACGCACCCCCCCGAGACTTCGCTGCTTATCGATCC

SEQ ID NO: 183, CD28 aa

FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQP
YAPPRDFAAYRS

SEQ ID NO: 184, OX40 nt

GTTGCCGCCATCCTGGGCCTGGGCCTGGTGCTGGGGCTGCTGGGCCCCCTGG
CCATCCTGCTGGCCCTGTACCTGCTCCGGGACCAGAGGCTGCCCCCCGATGCC
CACAAGCCCCCTGGGGGAGGCAGTTTCCGGACCCCCATCCAAGAGGAGCAGG
CCGACGCCCACTCCACCCTGGCCAAGATC

SEQ ID NO: 185, OX40 aa

VAAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHS
TLAKI

SEQ ID NO: 186, 4-1BB nt

AGTGTAGTTAAAAGAGGAAGAAAAAAGTTGCTGTATATATTTAAACAACCATTTAT
GAGACCAGTGCAAACCACCCAAGAAGAAGACGGATGTTCATGCAGATTCCCAG
AAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAATTG

SEQ ID NO: 187, 4-1BB aa
SVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

Expresión de receptores de antígenos quiméricos MyD88/CD40 y moléculas de estimulación quiméricas

Los siguientes ejemplos analizan las composiciones y los métodos relativos a los receptores de antígenos quiméricos MycD88/CD40 y a moléculas de estimulación quiméricas, como se proporcionan en la presente solicitud. Asimismo, se incluyen composiciones y métodos relacionados con un interruptor de seguridad a base de Caspasa-9 y su uso en células que expresan los receptores de antígenos quiméricos MycD88/CD40 o moléculas estimulantes quiméricas.

Ejemplo 11: Diseño y actividad de receptores de antígenos quiméricos MyD88/CD40

Diseño de las construcciones de MC-CAR

Basándose en los datos de activación de experimentos de MyD88/CD40 inducible, se examinó el potencial de la señalización de MC en una molécula de CAR en lugar de los endodominios convencionales (por ejemplo, CD28 y 4-1BB). Se subclonó MC (sin las regiones FKBPv36 de unión a AP1903) en PSCA.ζ para emular la posición del ectodominio de CD28. Se generó retrovirus para cada una de las tres construcciones, linfocitos T humanos transducidos y la eficacia de la transducción medida posteriormente, demostrando que podía expresarse PSCA.MC.ζ. Para confirmar que los linfocitos T que portan cada una de estas construcciones de CAR conservaban su capacidad para reconocer células tumorales PSCA+, se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad de 6 horas, que demostraron la lisis de células diana Capan-1. Por lo tanto, la adición de MC en la región citoplasmática de una molécula de CAR no afecta a la expresión de CAR o al reconocimiento del antígeno en células diana.

La coestimulación con MC potencia la eliminación de linfocitos T, la proliferación y la supervivencia en linfocitos T modificados con CAR

Como se demostró en ensayos de citotoxicidad a corto plazo, cada uno de los tres diseños de CAR mostró la capacidad para reconocer y lisar células tumorales Capan-1. La función efectora citolítica en linfocitos T efectores está mediada por la liberación de granzimas preformadas y perforina después del reconocimiento tumoral y la activación mediante CD3ζ es suficiente para inducir este proceso sin la necesidad de coestimulación. Los linfocitos CAR T de primera generación (por ejemplo, CAR construidos solamente con la región citoplasmática de CD3ζ) pueden lisar células tumorales; sin embargo, la supervivencia y proliferación se ve impedida debido a la falta de coestimulación. Por lo tanto, la adición de los dominios coestimulantes CD28 o 4-1BB ha mejorado significativamente la supervivencia y la capacidad proliferativa de los linfocitos CAR T.

Para examinar si MC puede proporcionar de manera similar señales coestimuladoras que afectan a la supervivencia y la proliferación, se llevaron a cabo ensayos de cocultivo con células tumorales PSCA+Capan-1 a altas proporciones de tumor:linfocitos T (1:1, 1:5, 1:10 linfocitos T a células tumorales). Cuando los números de linfocitos T y de células tumorales era igual a (1:1), hubo una eliminación eficaz de células Capan-1-GFP de las tres construcciones, en comparación con linfocitos T de control no transducidos. Sin embargo, cuando se expusieron los linfocitos CAR T a altos números de células tumorales (1:10), hubo una reducción significativa de las células tumorales Capan-1-GFP solo cuando la molécula CAR contenía MC o CD28.
Para examinar adicionalmente el mecanismo de coestimulación por estos dos CAR, se ensayó la viabilidad celular y la proliferación. Los CAR para PSCA que contenían MC o CD28 mostraron una supervivencia mejorada en comparación con los linfocitos T no transducidos y el CAR solo para CD3ζ y la proliferación de linfocitos T por PSCA.MC.ζ y PSCA.28.ζ se mejoró significativamente. Ya que otros grupos han demostrado que los CAR que contienen regiones de señalización coestimulantes producen IL-2, una molécula clave para la supervivencia y crecimiento de linfocitos T (4), se llevaron a cabo ELISA en sobrenadantes de linfocitos CAR T expuestos a células tumorales Capan-1. Aunque PSCA.28.ζ produjo altos niveles de IL-2, la señalización de PSCA.MC.ζ también produjo niveles significativos de IL-2, lo que probablemente contribuye a la supervivencia observada de linfocitos T y a su expansión en estos ensayos. Además, se examinó la producción de IL-6 por linfocitos T modificados con CAR, ya que se ha relacionado la IL-6 como citoquina clave en la potencia y eficacia de linfocitos T modificados con CAR (15). A diferencia de IL-2, PSCA.MC.ζ produjeron mayores niveles de IL-6 en comparación con PSCA.28.ζ, lo que es coherente con las observaciones de que la activación de iMC en linfocitos T primarios induce a IL-6. Conjuntamente, estos datos sugieren que la coestimulación a través de MC produce efectos similares a los de CD28, tras lo cual, después del reconocimiento de células tumorales, los linfocitos T modificados con CAR producen IL-2 e IL-6, que potencian la supervivencia de linfocitos T.

La inmunoterapia usando linfocitos T modificados con CAR es muy prometedora para el tratamiento de una variedad de neoplasias malignas. Aunque los CAR se diseñaron inicialmente con un solo dominio de señalización (por ejemplo, CD3ζ, (16-19) los ensayos clínicos que evaluaron la viabilidad de la inmunoterapia con CAR mostraron un beneficio clínico limitado (1,2,20,21) Esto se ha atribuido principalmente a la activación incompleta de linfocitos T después del reconocimiento tumoral, lo que da lugar a la persistencia y expansión limitadas *in vivo*. (22) Para abordar esta deficiencia, se han modificado CAR para incluir otro dominio estimulante, a menudo procedente de la porción citoplasmática de moléculas coestimulantes de linfocitos T que incluyen CD28, 4-1BB, OX40, ICOS y DAP10, (4,23-30) que permiten a los linfocitos CAR T recibir la coestimulación adecuada tras el acoplamiento del antígeno diana. De hecho, los ensayos clínicos llevados a cabo con CAR anti-CD19 que portan dominios de señalización de CD28 o 4-1BB para el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda resistente (ALL) han demostrado en linfocitos T una impresionante persistencia, expansión y eliminación tumoral en serie después de la transferencia adoptiva. (6-8)

La coestimulación de CD28 proporciona una clara ventaja clínica para el tratamiento de linfomas $CD19^+$. Savoldo y colaboradores llevaron a cabo un ensayo clínico con linfocitos CAR-T que comparó CAR de primera generación (CD19.ζ) y de segunda generación (CD19.28.ζ) y descubrieron que CD28 potenció la persistencia y expansión de linfocitos T después de la transferencia adoptiva.31 Una de las principales funciones de los CAR de segunda generación es la capacidad para producir IL-2 que soporta la supervivencia celular y el crecimiento mediante la activación del factor de transcripción NFAT por CD3ζ (señal 1) y NF-κB (señal 2) por CD28 o 4-1 BB.32 Esto sugirió que otras moléculas que activaban a NF-κB podrían estar emparejadas con la cadena CD3ζ en una molécula de CAR. La presente estrategia ha empleado una molécula coestimuladora de linfocitos T que inicialmente se desarrolló como adyuvante para una vacuna con células dendríticas (CD). (12,33) Para la activación completa o licenciatura de las CD, la señalización de TLR está normalmente implicada en la regulación positiva del miembro de la familia de TNF, CD40, que interactúa con CD40L en linfocitos T $CD4^+$ cebados con antígeno. Debido a que iMC era un potente activador de NF-κB en las CD, la transducción de linfocitos T con CAR que incorporan MyD88 y CD40 podría proporcionar la coestimulación necesaria (señal 2) para linfocitos T y potenciar su supervivencia y proliferación.
Se llevó a cabo un conjunto de experimentos para examinar si MyD88, CD40 o ambos componentes eran necesarios para la estimulación óptima de linfocitos T usando la molécula de iMC. De manera destacable, se descubrió que ni MyD88 ni CD40 podían inducir suficientemente la activación de linfocitos T, según se mide por la producción de citoquinas (IL-2 e IL-6), pero cuando se combinaron como una sola proteína de fusión, se pudo inducir una potente activación de linfocitos T. Se construyó un CAR de PSCA que incorpora MC y posteriormente se comparó su función

frente a un CAR de primera generación (PSCA.ζ) y de segunda (PSCA.28.ζ). En este caso se observó que MC potenciaba la supervivencia y proliferación de linfocitos CAT T a un nivel comparable al del endodominio de CD28, lo que sugiere que era suficiente la coestimulación. Aunque los linfocitos T transducidos con CAR para PSCA.MC.ζ produjeron niveles menores de IL-2 que PSCA.28.ζ, los niveles secretados fueron significativamente mayores que los linfocitos T no transducidos y los linfocitos T transducidos con el CAR para PSCA.ζ. Por otro lado, los linfocitos T transducidos con CAR para PSCA.MC.ζ secretaron niveles significativamente mayores de IL-6, una importante citoquina asociada con la activación de linfocitos T, que los linfocitos T transducidos con PSCA.28.ζ, lo que indica que MC confirió propiedades únicas a la función del CAR que pueden traducirse en una eliminación tumoral mejorada *in vivo*. Estos experimentos indican que MC puede activar a NF-κB (señal 2) después del reconocimiento del antígeno por el dominio extracelular del CAR.

Diseño y validación funcional de MC-CAR. Se diseñaron tres construcciones de CAR para PSCA que incorporan únicamente CD3ζ o con endodominios de CD28 o MC. Se midió la eficacia de la transducción (porcentaje) mediante APC anti-CAR (que reconocen el dominio CH_2CH_3 de IgG1). C) Análisis de citometría de flujo que demuestra la alta eficacia de la transducción de linfocitos T con CAR para PSCA.MC.ζ. D) Análisis de la lisis específica de células tumorales Capan-1 $PSCA^+$ por linfocitos T modificados con CAR en un ensayo de liberación de LDH de 6 horas a una relación de 1:1 linfocitos T a células tumorales.

Los linfocitos T modificados con MC-CAR eliminan a células tumorales Capan-1 en ensayos de cocultivo a largo plazo. Análisis por citometría de flujo de linfocitos T modificados con CAR y no transducidos cultivados con células tumorales Capan-1-GFP después de 7 días en cultivo a una relación 1:1. Cuantificación de células GFP^+ viables mediante citometría de flujo en ensayos de cocultivo a una relación de linfocitos T a células tumorales de 1:1 y 1:10.

La estimulación con MC y CD28 potencia en linfocitos T la supervivencia, la proliferación y la producción de citoquinas. Se ensayaron linfocitos T aislados de ensayos de cocultivo de 1:10 de linfocitos T a células tumorales para viabilidad celular y número celular para evaluar la supervivencia y la proliferación en respuesta a la exposición a células tumorales. Posteriormente se midieron los sobrenadantes de ensayos de cocultivo respecto de la producción de IL-2 e IL-6 mediante ELISA.

Diseño de moléculas coestimuladoras inducibles y efecto en la activación de linfocitos T. Se diseñaron cuatro vectores que incorporaban dominios de unión a AP1903 FKBPv36 (Fv'.Fv) solo o con MyD88, CD40 o la proteína de fusión MyD88/CD40. Análisis de eficacia de la transducción de linfocitos T primarios activados usando análisis por citometría de flujo para $CD3^+CD19^+$. Análisis de la producción de IFN-γ de linfocitos T modificados después de la activación con y sin AP1903 10 nM. Análisis de la producción de IL-6 de linfocitos T modificados después de la activación con y sin AP1903 10 nM.

Aparte de las ventajas de supervivencia y crecimiento, la coestimulación inducida por MC también puede proporcionar funciones adicionales a los linfocitos T modificados con CAR. Medzhitov y colaboradores demostraron recientemente que la señalización de MyD88 era crítica para las respuestas tanto de Th1 como de Th17 y que actuó a través de IL-1 para hacer a los linfocitos T $CD4^+$ refractarios a la inhibición impulsada por linfocitos T reguladores (Treg).(34) Los experimentos con iMC muestran que IL-1α y β se secretan después de la activación de AP1903. Además, Martin et al demostraron que la señalización de CD40 en linfocitos T $CD8^+$ a través de Ras, PI3K y proteína quinasa C, da como resultado la inducción dependiente de NF-κB de los mediadores citotóxicos granzima y perforina que lisan a las células Treg $CD4^+CD25^+$ (35). Por lo tanto, la coactivación de MyD88 y CD40 puede hacer que los linfocitos CAR-T sean resistentes a los efectos inmunosupresores de células Treg, una función que podría tener una importancia crítica en el tratamiento de tumores sólidos y otros tipos de cánceres.

En resumen, pueden incorporarse MC en una molécula de CAR y los linfocitos T primarios transducidos con retrovirus pueden expresar PSCA.MC.ζ sin toxicidad evidente o problemas de estabilidad del CAR. Además, MC parece proporcionar una coestimulación similar a la de CD28, donde los linfocitos T transducidos muestran supervivencia mejorada, proliferación y eliminación de tumores en comparación con linfocitos T transducidos con un CAR de primera generación.

Ejemplo 12: Referencias

Las siguientes referencias se citan en, o proporcionan información adicional que puede ser relevante para, incluyendo, por ejemplo, el ejemplo 11.

1. Till BG, Jensen MC, Wang J, et al: CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: pilot clinical trial results. Blood 119:3940-50, 2012.
2. Pule MA, Savoldo B, Myers GD, et al: Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. Nat Med 14:1264-70, 2008.
3. Kershaw MH, Westwood JA, Parker LL, et al: A phase 1 study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. Clin Cancer Res 12:6106-15, 2006.
4. Carpenito C, Milone MC, Hassan R, et al: Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. Proc Natl Acad Sci U S A 106:3360-5, 2009.

5. Song DG, Ye Q, Poussin M, et al: CD27 costimulation augments the survival and antitumor activity of redirected human T cells *in vivo*. Blood 119:696-706, 2012.
6. Kalos M, Levine BL, Porter DL, et al: T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. Sci Transl Med 3:95ra73, 2011.
7. Porter DL, Levine BL, Kalos M, et al: Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. N Engl J Med 365:725-33, 2011.
8. Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, et al: CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. Sci Transl Med 5:177ra38, 2013.
9. Pule MA, Straathof KC, Dotti G, et al: A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells. Mol Ther 12:933-41,2005.
10. Finney HM, Akbar AN, Lawson AD: Activation of resting human primary T cells with chimeric receptors: costimulation from CD28, inducible costimulator, CD134, and CD137 in series with signals from the TCR zeta chain. J Immunol 172:104-13,2004.
11. Guedan S, Chen X, Madar A, et al: ICOS-based chimeric antigen receptors program bipolar TH17/TH1 cells. Blood, 2014.
12. Narayanan P, Lapteva N, Seethammagari M, et al: A composite MyD88/CD40 switch synergistically activates mouse and human dendritic cells for enhanced antitumor efficacy. J Clin Invest 121:1524-34, 2011.
13. Anurathapan U, Chan RC, Hindi HF, et al: Kinetics of tumor destruction by chimeric antigen receptor-modified T cells. Mol Ther 22:623-33, 2014.
14. Craddock JA, Lu A, Bear A, et al: Enhanced tumor trafficking of GD2 chimeric antigen receptor T cells by expression of the chemokine receptor CCR2b. J Immunother 33:780-8, 2010.
15. Lee DW, Gardner R, Porter DL, et al: Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. Blood 124:188-95, 2014.
16. Becker ML, Near R, Mudgett-Hunter M, et al: Expression of a hybrid immunoglobulin-T cell receptor protein in transgenic mice. Cell 58:911-21, 1989.
17. Goverman J, Gomez SM, Segesman KD, et al: Chimeric immunoglobulin-T cell receptor proteins form functional receptors: implications for T cell receptor complex formation and activation. Cell 60:929-39, 1990.
18. Gross G, Waks T, Eshhar Z: Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. Proc Natl Acad Sci U S A 86:10024-8, 1989.
19. Kuwana Y, Asakura Y, Utsunomiya N, et al: Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions and T-cell receptor-derived C regions. Biochem Biophys Res Commun 149:960-8, 1987.
20. Jensen MC, Popplewell L, Cooper LJ, et al: Antitransgene rejection responses contribute to attenuated persistence of adoptively transferred CD20/CD19-specific chimeric antigen receptor redirected T cells in humans. Biol Blood Marrow Transplant 16:1245-56, 2010.
21. Park JR, Digiusto DL, Slovak M, et al: Adoptive transfer of chimeric antigen receptor re-directed cytolytic T lymphocyte clones in patients with neuroblastoma. Mol Ther 15:825-33, 2007.
22. Ramos CA, Dotti G: Chimeric antigen receptor (CAR)-engineered lymphocytes for cancer therapy. Expert Opin Biol Ther 11:855-73, 2011.
23. Finney HM, Lawson AD, Bebbington CR, et al: Chimeric receptors providing both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene product. J Immunol 161:2791-7, 1998.
24. Hombach A, Wieczarkowiecz A, Marquardt T, et al: Tumor-specific T cell activation by recombinant immunore-ceptors: CD3 zeta signaling and CD28 costimulation are simultaneously required for efficient IL-2 secretion and can be integrated into one combined CD28/CD3 zeta signaling receptor molecule. J Immunol 167:6123-31,2001.
25. Maher J, Brentjens RJ, Gunset G, et al: Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor. Nat Biotechnol 20:70-5, 2002.
26. Imai C, Mihara K, Andreansky M, et al: Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 18:676-84, 2004.
27. Wang J, Jensen M, Lin Y, et al: Optimizing adoptive polyclonal T cell immunotherapy of lymphomas, using a chimeric T cell receptor possessing CD28 and CD137 costimulatory domains. Hum Gene Ther 18:712-25, 2007.
28. Zhao Y, Wang QJ, Yang S, et al: A herceptin-based chimeric antigen receptor with modified signaling domains leads to enhanced survival of transduced T lymphocytes and antitumor activity. J Immunol 183:5563-74, 2009.
29. Milone MC, Fish JD, Carpenito C, et al: Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy *in vivo*. Mol Ther 17:1453-64, 2009.
30. Yvon E, Del Vecchio M, Savoldo B, et al: Immunotherapy of metastatic melanoma using genetically engineered GD2-specific T cells. Clin Cancer Res 15:5852-60, 2009.
31. Savoldo B, Ramos CA, Liu E, et al: CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients. J Clin Invest 121:1822-6, 2011.
32. Kalinski P, Hilkens CM, Wierenga EA, et al: T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. Immunol Today 20:561-7, 1999.
33. Kemnade JO, Seethammagari M, Narayanan P, et al: Off-the-shelf Adenoviral-mediated Immunotherapy via Bicistronic Expression of Tumor Antigen and iMyD88/CD40 Adjuvant. Mol Ther, 2012.
34. Schenten D, Nish SA, Yu S, et al: Signaling through the adaptor molecule MyD88 in $CD4^+$ T cells is required to overcome suppression by regulatory T cells. Immunity 40:78-90, 2014.
35. Martin S, Pahari S, Sudan R, et al: CD40 signaling in $CD8^+CD40^+$ T cells turns on contra-T regulatory cell

functions. J Immunol 184:5510-8, 2010

Ejemplo 13: La coestimulación con MC potencia la función y proliferación de CAR para CD19

Se proporcionan experimentos similares a los analizados en el presente documento, usando un motivo de reconocimiento de antígeno que reconoce al antígeno CD19. Se entiende que los vectores proporcionados en el presente documento pueden modificarse para construir una construcción de CAR para MyD88/CD40 que se dirige a células tumorales $CD19^+$, que también incorpora un interruptor de seguridad de Caspasa-9.

Para examinar si la coestimulación con MC funcionó en CAR que se dirigen a otros antígenos, se modificaron linfocitos T con CD19.ζ o con CD19.MC.ζ. Se ensayaron la citotoxicidad, activación y supervivencia contra líneas celulares de linfoma de Burkitt (Raji y Daudi) CD19+ de las células modificadas. En ensayos de cocultivo, los linfocitos T transducidos con cualquiera de los CAR mostró eliminación de células Raji CD19+ a una relación de efector a diana tan baja como de 1:1. Sin embargo, el análisis de la producción de citoquinas a partir de ensayos de cocultivo mostró que los linfocitos T transducidos con CD19.MC.ζ produjeron mayores niveles de IL-2 e IL-6 en comparación con CD19.ζ, lo que es coherente con los efectos coestimularoes observados con iMC y CAR para PSCA que contienen el dominio de señalización de MC. Además, los linfocitos T transducidos con CD19.MC.ζ mostraron una proliferación potenciada después de la activación mediante células tumorales Raji. Estos datos respaldan los experimentos anteriores que demuestran que la señalización de MC en moléculas de CAR mejora en linfocitos T la activación, la supervivencia y la proliferación después del ligamiento a un antígeno diana expresado en células tumorales.

SFG.iCasp9wt.2A.CD19scFv.CD34e.CD8stm.MC.zeta de pBP0526

SEQ ID NO: 116 FKBPv36

ATGCTGGAGGGAGTGCAGGTGGAGACTATTAGCCCCGGAGATGGCAGAACATT
CCCCAAAAGAGGACAGACTTGCGTCGTGCATTATACTGGAATGCTGGAAGACG
GCAAGAAGGTGGACAGCAGCCGGGACCGAAACAAGCCCTTCAAGTTCATGCTG
GGGAAGCAGGAAGTGATCCGGGGCTGGGAGGAAGGAGTCGCACAGATGTCAG
TGGGACAGAGGGCCAAACTGACTATTAGCCCAGACTACGCTTATGGAGCAACC

GGCCACCCCGGGATCATTCCCCCTCATGCTACACTGGTCTTCGATGTGGAGCT
GCTGAAGCTGGAA

SEQ ID NO: 117 FKBPv36

MLEGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKPFKFMLGK
QEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE

SEQ ID NO: 118 Enlazador
AGCGGAGGAGGATCCGGA

SEQ ID NO: 119 Enlazador
SGGGSG

SEQ ID NO: 120 Caspasa-9

GTGGACGGGTTTGGAGATGTGGGAGCCCTGGAATCCCTGCGGGGCAATGCCG
ATCTGGCTTACATCCTGTCTATGGAGCCTTGCGGCCACTGTCTGATCATTAACA
ATGTGAACTTCTGCAGAGAGAGCGGGCTGCGGACCAGAACAGGATCCAATATT
GACTGTGAAAAGCTGCGGAGAAGGTTCTCTAGTCTGCACTTTATGGTCGAGGTG
AAAGGCGATCTGACCGCTAAGAAAATGGTGCTGGCCCTGCTGGAACTGGCTCG
GCAGGACCATGGGGCACTGGATTGCTGCGTGGTCGTGATCCTGAGTCACGGCT
GCCAGGCTTCACATCTGCAGTTCCCTGGGGCAGTCTATGGAACTGACGGCTGT
CCAGTCAGCGTGGAGAAGATCGTGAACATCTTCAACGGCACCTCTTGCCCAAGT
CTGGGCGGGAAGCCCAAACTGTTCTTTATTCAGGCCTGTGGAGGCGAGCAGAA
AGATCACGGCTTCGAAGTGGCTAGCACCTCCCCCGAGGACGAATCACCTGGAA
GCAACCCTGAGCCAGATGCAACCCCCTTCCAGGAAGGCCTGAGGACATTTGAC
CAGCTGGATGCCATCTCAAGCCTGCCCACACCTTCTGACATTTTCGTCTCTTAC
AGTACTTTCCCTGGATTTGTGAGCTGGCGCGATCCAAAGTCAGGCAGCTGGTAC
GTGGAGACACTGGACGATATCTTTGAGCAGTGGGCCCATTCTGAAGACCTGCA
GAGTCTGCTGCTGCGAGTGGCCAATGCTGTCTCTGTGAAGGGGATCTACAAAC
AGATGCCAGGATGCTTCAACTTTCTGAGAAAGAAACTGTTCTTTAAGACCTCCG
CATCTAGGGCC

SEQ ID NO: 121 Caspasa-9

VDGFGDVGALESLRGNADLAYILSMEPCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEK
LRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELARQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQ
FPGAVYGTDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVAST
SPEDESPGSNPEPDATPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPK

SGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKLFFK
TSASRA

SEQ ID NO: 122 Enlazador
CCGCGG

SEQ ID NO: 123 Enlazador
PR

SEQ ID NO: 124 T2A

GAAGGCCGAGGGAGCCTGCTGACATGTGGCGATGTGGAGGAAAACCCAGGAC
CA

SEQ ID NO: 125 T2A
EGRGSLLTCGDVEENPGP

SEQ ID NO: 126 Enlazador
CCATGG

SEQ ID NO: 127 Enlazador
PW
SEQ ID NO: 128 Péptido de señal

ATGGAGTTTGGACTTTCTTGGTTGTTTTTGGTGGCAATTCTGAAGGGTGTCCAGT
GTAGCAGG

SEQ ID NO: 129 Péptido de señal
MEFGLSWLFLVAILKGVQCSR

SEQ ID NO: 130 Cadena ligera variable de FMC63 (anti-CD19)

GACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGA
GTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAATTGGTATC
AGCAGAAACCAGATGGAACTGTTAAACTCCTGATCTACCATACATCAAGATTACA
CTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCT
CACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGG
TAATACGCTTCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACTAAGTTGGAAATAACA

SEQ ID NO: 131 Cadena ligera variable de FMC63 (anti CD19)

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSG
VPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIT

SEQ ID NO: 132 Enlazador flexible
GGCGGAGGAAGCGGAGGTGGGGGC

SEQ ID NO: 133 Enlazador flexible
GGGSGGGG

SEQ ID NO: 134 Cadena pesada variable de FMC63 (anti-CD19)

GAGGTGAAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCC
TGTCCGTCACATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAGCT
GGATTCGCCAGCCTCCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGT
AGTGAAACCACATACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGACCATCATCAAGG
ACAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACTGATGACAC
AGCCATTTACTACTGTGCCAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGAC
TACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 135 Cadena pesada variable de FMC63 (anti CD19)

EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSE
TTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWG
QGTSVTVSS

SEQ ID NO: 136 Enlazador
GGATCC
SEQ ID NO: 137 Enlazador
GS

SEQ ID NO: 138 Epítopo mínimo de CD34

GAACTTCCTACTCAGGGGACTTTCTCAAACGTTAGCACAAACGTAAGT

SEQ ID NO: 139 Epítopo mínimo de CD34
ELPTQGTFSNVSTNVS

SEQ ID NO: 140 dominio de tallo de CD8 α
CCCGCCCCAAGACCCCCCACACCTGCGCCGACCATTGCTTCTCAACCCCTGAG
TTTGAGACCCGAGGCCTGCCGGCCAGCTGCCGGCGGGGCCGTGCATACAAGA
GGACTCGATTTCGCTTGCGAC

SEQ ID NO: 141 dominio de tallo de CD8 α
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD

SEQ ID NO: 142 dominio transmembrana de CD8 α
ATCTATATCTGGGCACCTCTCGCTGGCACCTGTGGAGTCCTTCTGCTCAGCCTG
GTTATTACTCTGTACTGTAATCACCGGAATCGCCGCCGCGTTTGTAAGTGTCCC
AGG

SEQ ID NO: 143 dominio transmembrana de CD8 α
IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPR

SEQ ID NO: 144 Enlazador
GTCGAC

SEQ ID NO: 145 Enlazador
VD

SEQ ID NO: 146 MyD88 truncado que carece del dominio TIR
ATGGCCGCTGGGGGCCCAGGCGCCGGATCAGCTGCTCCCGTATCTTCTACTTC
TTCTTTGCCGCTGGCTGCTCTGAACATGCGCGTGAGAAGACGCCTCTCCCTGTT
CCTTAACGTTCGCACACAAGTCGCTGCCGATTGGACCGCCCTTGCCGAAGAAAT
GGACTTTGAATACCTGGAAATTAGACAACTTGAAACACAGGCCGACCCCACTGG
CAGACTCCTGGACGCATGGCAGGGAAGACCTGGTGCAAGCGTTGGACGGCTC
CTGGATCTCCTGACAAAACTGGGACGCGACGACGTACTGCTTGAACTCGGACC
TAGCATTGAAGAAGACTGCCAAAAATATATCCTGAAACAACAACAAGAAGAAGC
CGAAAAACCTCTCCAAGTCGCAGCAGTGGACTCATCAGTACCCCGAACAGCTG
AGCTTGCTGGGATTACTACACTCGACGACCCACTCGGACATATGCCTGAAAGAT
TCGACGCTTTCATTTGCTATTGCCCCTCTGACATA

SEQ ID NO: 147 MyD88 truncado que carece del dominio TIR

MAAGGPGAGSAAPVSSTSSLPLAALNMRVRRRLSLFLNVRTQVAADWTALAEEMD
FEYLEIRQLETQADPTGRLLDAWQGRPGASVGRLLDLLTKLGRDDVLLELGPSIEED

CQKYILKQQQEEAEKPLQVAAVDSSVPRTAELAGITTLDDPLGHMPERFDAFICYCP
SDI

SEQ ID NO: 148 CD40 sin el dominio extracelular

AAGAAAGTTGCAAAGAAACCCACAAATAAAGCCCCACACCCTAAACAGGAACCC
CAAGAAATCAATTTCCCAGATGATCTCCCTGGATCTAATACTGCCGCCCCGGTC
CAAGAAACCCTGCATGGTTGCCAGCCTGTCACCCAAGAGGACGGAAAAGAATC
ACGGATTAGCGTACAAGAGAGACAA

SEQ ID NO: 149 CD40 sin el dominio extracelular
KKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRI
SVQERQ

SEQ ID NO: 150 CD3 zeta
AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGA
ACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGG
ACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAA
CCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCT
ACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGG
CCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACAT
GCAGGCCCTGCCCCCTCGC

SEQ ID NO: 151 CD3 zeta
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP
QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL
PPR

Ejemplo 14: Producción de citoquinas de linfocitos T que coexpresan un receptor de antígeno quimérico MyD88/CD40 y polipéptido de Caspasa-9 inducible

Se crearon varias construcciones de receptor de antígeno quimérico para comparar la producción de citoquinas de los linfocitos T transducidos después de la exposición al antígeno. Todas las construcciones de receptor de antígeno quimérico tenían una región de reconocimiento que se unía a CD19. Se entiende que los vectores proporcionados en el presente documento pueden modificarse para construir una construcción de CAR que también incorpore un interruptor de seguridad de Caspasa-9 inducible. Además, se entiende que la construcción de CAR puede comprender además un dominio FRB.

Ejemplo 15: Un ejemplo de una construcción de CAR para MyD88/CD40 CAR para dirigirse a células tumorales Her2^{+}

Se entiende que los vectores proporcionados en el presente documento pueden modificarse para construir una construcción de CAR para MyD88/CD40 que se dirige a células tumorales Her2^{+}, que también incorpora un interruptor de seguridad de Caspasa-9. Además, se entiende que la construcción de CAR puede comprender además un dominio FRB.
Secuencia de SFG-Her2scFv.CD34e.CD8stm.MC.zeta

SEQ ID NO: 152 Péptido de señal
ATGGAGTTTGGACTTTCTTGGTTGTTTTTGGTGGCAATTCTGAAGGGTGTCCAGT
GTAGCAGG

SEQ ID NO: 153 Péptido de señal
MEFGLSWLFLVAILKGVQCSR

SEQ ID NO: 154 Cadena ligera variable de FRP5 (anti-Her2)

GACATCCAATTGACACAATCACACAAATTTCTCTCAACTTCTGTAGGAGACAGAG
TGAGCATAACCTGCAAAGCATCCCAGGACGTGTACAATGCTGTGGCTTGGTACC
AACAGAAGCCTGGACAATCCCCAAAATTGCTGATTTATTCTGCCTCTAGTAGGTA
CACTGGGGTACCTTCTCGGTTTACGGGCTCTGGGTCCGGACCAGATTTCACGTT
CACAATCAGTTCCGTTCAAGCTGAAGACCTCGCTGTTTATTTTTGCCAGCAGCA
CTTCCGAACCCCTTTTACTTTTGGCTCAGGCACTAAGTTGGAAATCAAGGCTTTG

SEQ ID NO: 155 Cadena ligera variable de FRP5 (anti-Her2)
DIQLTQSHKFLSTSVGDRVSITCKASQDVYNAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASSRYT
GVPSRFTGSGSGPDFTFTISSVQAEDLAVYFCQQHFRTPFTFGSGTKLEIKAL

SEQ ID NO: 156 Enlazador flexible
GGCGGAGGAAGCGGAGGTGGGGGC

SEQ ID NO: 157 Enlazador flexible
GGGSGGGG

SEQ ID NO: 158 Cadena pesada variable de FRP5 (anti-Her2/Neu)
GAAGTCCAATTGCAACAGTCAGGCCCCGAATTGAAAAAGCCCGGCGAAACAGT
GAAGATATCTTGTAAAGCCTCCGGTTACCCTTTTACGAACTATGGAATGAACTGG

GTCAAACAAGCCCCTGGACAGGGATTGAAGTGGATGGGATGGATCAATACATC
AACAGGCGAGTCTACCTTCGCAGATGATTTCAAAGGTCGCTTTGACTTCTCACT
GGAGACCAGTGCAAATACCGCCTACCTTCAGATTAACAATCTTAAAAGCGAGGA
TATGGCAACCTACTTTTGCGCAAGATGGGAAGTTTATCACGGGTACGTGCCATA
CTGGGGACAAGGAACGACAGTGACAGTTAGTAGC

SEQ ID NO: 159 Cadena pesada variable de FRP5 (anti-Her2/Neu)
EVQLQQSGPELKKPGETVKISCKASGYPFTNYGMNWVKQAPGQGLKWMGWINTS
TGESTFADDFKGRFDFSLETSANTAYLQINNLKSEDMATYFCARWEVYHGYVPYW
GQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 160 Enlazador
GGATCC

SEQ ID NO: 161 Enlazador
GS

SEQ ID NO: 162 Epítopo mínimo de CD34
GAACTTCCTACTCAGGGGACTTTCTCAAACGTTAGCACAAACGTAAGT

SEQ ID NO: 163 Epítopo mínimo de CD34
ELPTQGTFSNVSTNVS

SEQ ID NO: 164 tallo de CD8 alfa
CCCGCCCCAAGACCCCCCACACCTGCGCCGACCATTGCTTCTCAACCCCTGAG
TTTGAGACCCGAGGCCTGCCGGCCAGCTGCCGGCGGGGCCGTGCATACAAGA
GGACTCGATTTCGCTTGCGAC

SEQ ID NO: 165 tallo de CD8 alfa
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD

SEQ ID NO: 166 Región transmembrana de CD8 alfa

ATCTATATCTGGGCACCTCTCGCTGGCACCTGTGGAGTCCTTCTGCTCAGCCTG
GTTATTACTCTGTACTGTAATCACCGGAATCGCCGCCGCGTTTGTAAGTGTCCC
AGG

SEQ ID NO: 167 Región transmembrana de CD8 alfa
IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPR

SEQ ID NO: 168 Enlazador
Ctcgag

SEQ ID NO: 169 Enlazador
LE

SEQ ID NO: 170 MyD88 truncado

ATGGCCGCTGGGGGCCCAGGCGCCGGATCAGCTGCTCCCGTATCTTCTACTTC
TTCTTTGCCGCTGGCTGCTCTGAACATGCGCGTGAGAAGACGCCTCTCCCTGTT
CCTTAACGTTCGCACACAAGTCGCTGCCGATTGGACCGCCCTTGCCGAAGAAAT
GGACTTTGAATACCTGGAAATTAGACAACTTGAAACACAGGCCGACCCCACTGG
CAGACTCCTGGACGCATGGCAGGGAAGACCTGGTGCAAGCGTTGGACGGCTC
CTGGATCTCCTGACAAAACTGGGACGCGACGACGTACTGCTTGAACTCGGACC
TAGCATTGAAGAAGACTGCCAAAAATATATCCTGAAACAACAACAAGAAGAAGC
CGAAAAACCTCTCCAAGTCGCAGCAGTGGACTCATCAGTACCCCGAACAGCTG
AGCTTGCTGGGATTACTACACTCGACGACCCACTCGGACATATGCCTGAAAGAT
TCGACGCTTTCATTTGCTATTGCCCCTCTGACATA

SEQ ID NO: 171 MyD88 truncado

MAAGGPGAGSAAPVSSTSSLPLAALNMRVRRRLSLFLNVRTQVAADWTALAEEMD
FEYLEIRQLETQADPTGRLLDAWQGRPGASVGRLLDLLTKLGRDDVLLELGPSIEED
CQKYILKQQQEEAEKPLQVAAVDSSVPRTAELAGITTLDDPLGHMPERFDAFICYCP
SDI

SEQ ID NO: 172 Dominio citoplasmático de CD40

AAGAAAGTTGCAAAGAAACCCACAAATAAAGCCCCACACCCTAAACAGGAACCC
CAAGAAATCAATTTCCCAGATGATCTCCCTGGATCTAATACTGCCGCCCCGGTC
CAAGAAACCCTGCATGGTTGCCAGCCTGTCACCCAAGAGGACGGAAAAGAATC
ACGGATTAGCGTACAAGAGAGACAA

SEQ ID NO: 173 Dominio citoplasmático de CD40

KKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRI
SVQERQ

SEQ ID NO: 174 Enlazador
gcggccgcagtcgag

SEQ ID NO: 175 Enlazador
AAAVE

SEQ ID NO: 176 Dominio citoplasmático de CD3 zeta

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGA
ACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGG
ACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAA
CCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCT
ACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGG
CCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACAT
GCAGGCCCTGCCCCCTCGC

SEQ ID NO: 177 Dominio citoplasmático de CD3 zeta

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP
QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL
PPR

Ejemplo 16: Secuencias adicionales

SEQ ID NO: 178, ΔCasp9 (res. 135-416)

G F G D V G A L E S L R G N A D L A Y I L S M E P C G H C L I
I N N V N F C R E S G L R T R T G S N I D C E K L R R R F S S
L H F M V E V K G D L T A K K M V L A L L E L A R Q D H G A L
D C C V V V I L S H G C Q A S H L Q F P G A V Y G T D G C P V
S V E K I V N I F N G T S C P S L G G K P K L F F I Q A C G G
E Q K D H G F E V A S T S P E D E S P G S N P E P D A T P F
Q E G L R T F D Q L D A I S S L P T P S D I F V S Y S T F P G F
V S W R D P K S G S W Y V E T L D D I F E Q W A H S E D L Q
S L L L R V A N A V S V K G I Y K Q M P G C F N F L R K K L F
F K T S

SEQ ID NO: 179, ΔCasp9 (res. 135-416) D330A, secuencia de nucleótidos

GGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCT
TACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAAC
TTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGA
GAAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCG
ACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCgGCAGGAC
CACGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCTGTCAGGC
CAGCCACCTGCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGT
CGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGA
GGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCA
TGGGTTTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACC
CCGAGCCAGATGCCACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTG
GCCGCCATATCTAGTTTGCCCACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT
TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAG
ACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCT
CCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAGATGCC
TGGTTGCTTTAATTTCCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAAACATCA

SEQ ID NO: 180, ΔCasp9 (res. 135-416) D330A, secuencia de aminoácidos

G F G D V G A L E S L R G N A D L A Y I L S M E P C G H C L I
I N N V N F C R E S G L R T R T G S N I D C E K L R R R F S S
L H F M V E V K G D L T A K K M V L A L L E L A R Q D H G A L
D C C V V V I L S H G C Q A S H L Q F P G A V Y G T D G C P V
S V E K I V N I F N G T S C P S L G G K P K L F F I Q A C G G
E Q K D H G F E V A S T S P E D E S P G S N P E P D A T P F
Q E G L R T F D Q L A A I S S L P T P S D I F V S Y S T F P G F
V S W R D P K S G S W Y V E T L D D I F E Q W A H S E D L Q
S L L L R V A N A V S V K G I Y K Q M P G C F N F L R K K L F
F K T S

SEQ ID NO: 181, ΔCasp9 (res. 135-416) N405Q, secuencia de nucleótidos

GGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCT
TACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAAC
TTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGA
GAAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCG
ACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCgGCAGGAC
CACGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCTGTCAGGC

CAGCCACCTGCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGT
CGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGA
GGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCA
TGGGTTTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACC
CCGAGCCAGATGCCACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTG
GACGCCATATCTAGTTTGCCCACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT
TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAG
ACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCT
CCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAGATGCC
TGGTTGCTTTCAGTTCCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAAACATCA

SEQ ID NO: 182, ΔCasp9 (res. 135-416) N405Q, secuencia de aminoácidos

G F G D V G A L E S L R G N A D L A Y I L S M E P C G H C L I
I N N V N F C R E S G L R T R T G S N I D C E K L R R R F S S
L H F M V E V K G D L T A K K M V L A L L E L A R Q D H G A L
D C C V V V I L S H G C Q A S H L Q F P G A V Y G T D G C P V
S V E K I V N I F N G T S C P S L G G K P K L F F I Q A C G G
E Q K D H G F E V A S T S P E D E S P G S N P E P D A T P F
Q E G L R T F D Q L D A I S S L P T P S D I F V S Y S T F P G F
V S W R D P K S G S W Y V E T L D D I F E Q W A H S E D L Q
S L L L R V A N A V S V K G I Y K Q M P G C F Q F L R K K L F
F K T S

SEQ ID NO: 183, ΔCasp9 (res. 135-416) D330A N405Q, secuencia de nucleótidos

GGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCT
TACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAAC
TTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGA
GAAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCG
ACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCgGCAGGAC
CACGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCTGTCAGGC
CAGCCACCTGCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGT
CGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGA
GGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCA
TGGGTTTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACC
CCGAGCCAGATGCCACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTG

GCCGCCATATCTAGTTTGCCCACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT
TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAG
ACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCT
CCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAGATGCC
TGGTTGCTTTCAGTTCCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAAACATCA

SEQ ID NO: 184, ΔCasp9 (res. 135-416) D330A N405Q, secuencia de aminoácidos

G F G D V G A L E S L R G N A D L A Y I L S M E P C G H C L I
I N N V N F C R E S G L R T R T G S N I D C E K L R R R F S S
L H F M V E V K G D L T A K K M V L A L L E L A R Q D H G A L
D C C V V V I L S H G C Q A S H L Q F P G A V Y G T D G C P V
S V E K I V N I F N G T S C P S L G G K P K L F F I Q A C G G
E Q K D H G F E V A S T S P E D E S P G S N P E P D A T P F
Q E G L R T F D Q L A A I S S L P T P S D I F V S Y S T F P G F
V S W R D P K S G S W Y V E T L D D I F E Q W A H S E D L Q
S L L L R V A N A V S V K G I Y K Q M P G C F Q F L R K K L F
F K T S

SEQ ID NO: 185, Caspase-9.co, secuencia de nucleótidos

GTGGACGGGTTTGGAGATGTGGGAGCCCTGGAATCCCTGCGGGGCAATGCCG
ATCTGGCTTACATCCTGTCTATGGAGCCTTGCGGCCACTGTCTGATCATTAACA
ATGTGAACTTCTGCAGAGAGAGCGGGCTGCGGACCAGAACAGGATCCAATATT
GACTGTGAAAAGCTGCGGAGAAGGTTCTCTAGTCTGCACTTTATGGTCGAGGTG
AAAGGCGATCTGACCGCTAAGAAAATGGTGCTGGCCCTGCTGGAACTGGCTCG
GCAGGACCATGGGGCACTGGATTGCTGCGTGGTCGTGATCCTGAGTCACGGCT
GCCAGGCTTCACATCTGCAGTTCCCTGGGGCAGTCTATGGAACTGACGGCTGT
CCAGTCAGCGTGGAGAAGATCGTGAACATCTTCAACGGCACCTCTTGCCCAAGT
CTGGGCGGGAAGCCCAAACTGTTCTTTATTCAGGCCTGTGGAGGCGAGCAGAA
AGATCACGGCTTCGAAGTGGCTAGCACCTCCCCCGAGGACGAATCACCTGGAA
GCAACCCTGAGCCAGATGCAACCCCCTTCCAGGAAGGCCTGAGGACATTTGAC
CAGCTGGATGCCATCTCAAGCCTGCCCACACCTTCTGACATTTTCGTCTCTTAC
AGTACTTTCCCTGGATTTGTGAGCTGGCGCGATCCAAAGTCAGGCAGCTGGTAC
GTGGAGACACTGGACGATATCTTTGAGCAGTGGGCCCATTCTGAAGACCTGCA
GAGTCTGCTGCTGCGAGTGGCCAATGCTGTCTCTGTGAAGGGGATCTACAAAC

AGATGCCAGGATGCTTCCAGTTTCTGAGAAAGAAACTGTTCTTTAAGACCTCCG
CATCTAGGGCC

SEQ ID NO: 186, Caspase-9.co, secuencia de aminoácidos

VDGFGDVGALESLRGNADLAYILSMEPCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEK
LRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELARQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQ
FPGAVYGTDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVAST
SPEDESPGSNPEPDATPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPK
SGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFQFLRKKLFFK
TSASRA

SEQ ID NO: 187: Secuencia de nucleótidos de Caspasa9 D330E

GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGA
TTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAA
TGTGAACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCG
ACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGGTG
AAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCG
GCAGGACCACGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCT
GTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGATGC
CCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAG
CCTGGGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGA
AAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGC
AGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGA
CCAGCTGGcCGCCATATCTAGTTTGCCCACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTA
CTCTACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTA
CGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAGACCTGC
AGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAAC
AGATGCCTGGTTGCTTTAATTTCCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAAACATCAGC
TAGCAGAGCC

SEQ ID NO: 188: Secuencia de aminoácidos de Caspasa9 D330E

VDGFGDVGALESLRGNADLAYILSMEPCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEK
LRRRFSS
LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELARQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYG
TDGC

PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSPEDESPGSNPE
PDA
TPFQEGLRTFDQLeAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQ
WAH
SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA

Secuencias para pBPO509

Secuencia de pBP0509-SFG-PSCAscFv.CH2CH3.CD28tm.zeta.MyD88/CD40

SEQ ID NO: 189 Péptido de señal

ATGGAGTTTGGACTTTCTTGGTTGTTTTTGGTGGCAATTCTGAAGGGTGTCCAGT
GTAGCAGG

SEQ ID NO: 190 Péptido de señal
MEFGLSWLFLVAILKGVQCSR

SEQ ID NO: 191 cadena ligera variable de bm2B3

GACATCCAGCTGACACAAAGTCCCAGTAGCCTGTCAGCCAGTGTCGGCGATAG
GGTGACAATTACATGCTCCGCAAGTAGTAGCGTCAGATTCATACACTGGTACCA
GCAGAAGCCTGGGAAGGCCCCAAAGAGGCTTATCTACGATACCAGTAAACTCG
CCTCTGGAGTTCCTAGCCGGTTTTCTGGATCTGGCAGCGGAACTAGCTACACCC
TCACAATCTCCAGTCTGCAACCAGAGGACTTTGCAACCTACTACTGCCAGCAAT
GGAGCAGCTCCCCTTTCACCTTTGGGCAGGGTACTAAGGTGGAGATCAAG

SEQ ID NO: 192 cadena ligera variable de bm2B3

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVRFIHWYQQKPGKAPKRLIYDTSKLASGV
PSRFSGSGSGTSYTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSSPFTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 193 Enlazador flexible
GGCGGAGGAAGCGGAGGTGGGGGC

SEQ ID NO: 194 Enlazador flexible
GGGSGGGG

SEQ ID NO: 195 Cadena pesada variable de bm2B3

GAGGTGCAGCTTGTAGAGAGCGGGGGAGGCCTCGTACAGCCAGGGGGCTCTC
TGCGCCTGTCATGTGCAGCTTCAGGATTCAATATAAAGGACTATTACATTCACTG
GGTACGGCAAGCTCCCGGTAAGGGCCTGGAATGGATCGGTTGGATCGACCCTG

AAAACGGAGATACAGAATTTGTGCCCAAGTTCCAGGGAAAGGCTACCATGTCTG
CCGATACTTCTAAGAATACAGCATACCTTCAGATGAATTCTCTCCGCGCCGAGG
ACACAGCCGTGTATTATTGTAAAACGGGAGGGTTCTGGGGTCAGGGTACCCTT
GTGACTGTGTCTTCC

SEQ ID NO: 196 Cadena pesada variable de bm2B3

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDYYIHWVRQAPGKGLEWIGWIDPEN
GDTEFVPKFQGKATMSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCKTGGFWGQGTLVTV
SS

SEQ ID NO: 197 Enlazador
GGGGATCCCGCC

SEQ ID NO: 198 Enlazador
GDPA

SEQ ID NO: 199 Regiones bisagra de IgG1
GAGCCCAAATCTCCTGACAAAACTCACACATGCCCA

SEQ ID NO: 200 Regiones bisagra de IgG1
EPKSPDKTHTCP

SEQ ID NO: 201 Región CH2 de IgG1

CCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCC
AAAACCCAAAGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGG
TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTATGTGGAC
GGCGTGGAGGTGCATAATGCAAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACA
GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAAT
GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGA
GAAAACCATCTCCAAAGCCAAA

SEQ ID NO: 202 Región CH2 de IgG1

PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

SEQ ID NO: 203 Región CH3 de IgG1

GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGC
TGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC

GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAACCGGAGAACAACTACAAGAC
CACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCA
CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG
CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGG
TAAA

SEQ ID NO: 204 Región CH3 de IgG1

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 205 Enlazador
AAAGATCCCAAA

SEQ ID NO: 206 Enlazador
KDPK

SEQ ID NO: 207 Región transmembrana de CD28

TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTA
ACAGTGGCCTTTATTATT

SEQ ID NO: 208 Región transmembrana de CD28
FWVLWVGGVLACYSLLVTVAFM

SEQ ID NO: 209 Enlazador
gccggc

SEQ ID NO: 210 Enlazador
AG
SEQ ID NO: 211 CD3 zeta

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGA
ACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGG
ACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAA
CCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCT
ACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGG
CCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACAT
GCAGGCCCTGCCCCCTCGC

SEQ ID NO: 212 CD3 zeta

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP
QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL
PPR

SEQ ID NO: 213 MyD88

GCCGCTGGGGGCCCAGGCGCCGGATCAGCTGCTCCCGTATCTTCTACTTCTTC
TTTGCCGCTGGCTGCTCTGAACATGCGCGTGAGAAGACGCCTCTCCCTGTTCCT
TAACGTTCGCACACAAGTCGCTGCCGATTGGACCGCCCTTGCCGAAGAAATGG
ACTTTGAATACCTGGAAATTAGACAACTTGAAACACAGGCCGACCCCACTGGCA
GACTCCTGGACGCATGGCAGGGAAGACCTGGTGCAAGCGTTGGACGGCTCCT
GGATCTCCTGACAAAACTGGGACGCGACGACGTACTGCTTGAACTCGGACCTA
GCATTGAAGAAGACTGCCAAAAATATATCCTGAAACAACAACAAGAAGAAGCCG
AAAAACCTCTCCAAGTCGCAGCAGTGGACTCATCAGTACCCCGAACAGCTGAG
CTTGCTGGGATTACTACACTCGACGACCCACTCGGACATATGCCTGAAAGATTC
GACGCTTTCATTTGCTATTGCCCCTCTGACATA

SEQ ID NO: 214 MyD88

AAGGPGAGSAAPVSSTSSLPLAALNMRVRRRLSLFLNVRTQVAADWTALAEEMDF
EYLEIRQLETQADPTGRLLDAWQGRPGASVGRLLDLLTKLGRDDVLLELGPSIEEDC
QKYILKQQQEEAEKPLQVAAVDSSVPRTAELAGITTLDDPLGHMPERFDAFICYCPS
DI

SEQ ID NO: 215 CD40

AAGAAAGTTGCAAAGAAACCCACAAATAAAGCCCCACACCCTAAACAGGAACCC
CAAGAAATCAATTTCCCAGATGATCTCCCTGGATCTAATACTGCCGCCCCGGTC
CAAGAAACCCTGCATGGTTGCCAGCCTGTCACCCAAGAGGACGGAAAAGAATC
ACGGATTAGCGTACAAGAGAGACAATAG

SEQ ID NO: 216 CD40

KKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRI
SVQERQ*

Secuencias para pBPO425

Secuencia de pBP0521-SFG-CD19scFv.CH2CH3.CD28tm.MyD88/CD40.zeta

SEQ ID NO: 217 Péptido de señal

ATGGAGTTTGGACTTTCTTGGTTGTTTTTGGTGGCAATTCTGAAGGGTGTCCAGT
GTAGCAGG

SEQ ID NO: 218 Péptido de señal
MEFGLSWLFLVAILKGVQCSR

SEQ ID NO: 219 cadena ligera variable de FMC63

GACATCCAGAT
GACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAG
TTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCA
GATGGAACTGTTAAACTCCTGATCTACCATACATCAAGATTACACTCAGGAGTCC
CATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCA
ACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTC
CGTACACGTTCGGAGGGGGGACTAAGTTGGAAATAACA

SEQ ID NO: 220 cadena ligera variable de FMC63

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSG
VPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIT

SEQ ID NO: 221 Enlazador flexible
GGCGGAGGAAGCGGAGGTGGGGGC

SEQ ID NO: 222 Enlazador flexible
GGGSGGGG

SEQ ID NO: 223 Cadena pesada variable de FMC63

GAGGTGAAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCC
TGTCCGTCACATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAGCT
GGATTCGCCAGCCTCCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGT
AGTGAAACCACATACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGACCATCATCAAGG
ACAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACTGATGACAC
AGCCATTTACTACTGTGCCAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGAC
TACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 224 Cadena pesada variable de FMC63

EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSE
TTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWG
QGTSVTVSS

SEQ ID NO: 225 Enlazador
GGGGATCCCGCC

SEQ ID NO: 226 Enlazador
GDPA

SEQ ID NO: 227 Bisagra de IgG1
GAGCCCAAATCTCCTGACAAAACTCACACATGCCCA

SEQ ID NO: 228 Bisagra de IgG1
EPKSPDKTHTCP

SEQ ID NO: 229 Región CH2 de IgG1

CCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCC
AAAACCCAAAGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGG
TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTATGTGGAC
GGCGTGGAGGTGCATAATGCAAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACA
GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAAT
GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGA
GAAAACCATCTCCAAAGCCAAA

SEQ ID NO: 230 Región CH2 de IgG1

PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

SEQ ID NO: 231 Región CH3 de IgG1

GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGC
TGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC
GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAACCGGAGAACAACTACAAGAC
CACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCA
CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG
CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGG
TAAA

SEQ ID NO: 232 Región CH3 de IgG1

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 233 Enlazador
AAAGATCCCAAA

SEQ ID NO: 234 Enlazador
KDPK

SEQ ID NO: 235 Región transmembrana de CD28

TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTA
ACAGTGGCCTTTATTATT

SEQ ID NO: 236 Región transmembrana de CD28
FWVLWVGGVLACYSLLVTVAFM

SEQ ID NO: 237 Enlazador
Ctcgag

SEQ ID NO: 238 Enlazador
LE

SEQ ID NO: 239 MyD88

ATGGCCGCTGGGGGCCCAGGCGCCGGATCAGCTGCTCCCGTATCTTCTACTTC
TTCTTTGCCGCTGGCTGCTCTGAACATGCGCGTGAGAAGACGCCTCTCCCTGTT
CCTTAACGTTCGCACACAAGTCGCTGCCGATTGGACCGCCCTTGCCGAAGAAAT
GGACTTTGAATACCTGGAAATTAGACAACTTGAAACACAGGCCGACCCCACTGG
CAGACTCCTGGACGCATGGCAGGGAAGACCTGGTGCAAGCGTTGGACGGCTC
CTGGATCTCCTGACAAAACTGGGACGCGACGACGTACTGCTTGAACTCGGACC
TAGCATTGAAGAAGACTGCCAAAAATATATCCTGAAACAACAACAAGAAGAAGC
CGAAAAACCTCTCCAAGTCGCAGCAGTGGACTCATCAGTACCCCGAACAGCTG
AGCTTGCTGGGATTACTACACTCGACGACCCACTCGGACATATGCCTGAAAGAT
TCGACGCTTTCATTTGCTATTGCCCCTCTGACATA

SEQ ID NO: 240 MyD88

MAAGGPGAGSAAPVSSTSSLPLAALNMRVRRRLSLFLNVRTQVAADWTALAEEMD
FEYLEIRQLETQADPTGRLLDAWQGRPGASVGRLLDLLTKLGRDDVLLELGPSIEED
CQKYILKQQQEEAEKPLQVAAVDSSVPRTAELAGITTLDDPLGHMPERFDAFICYCP
SDI

SEQ ID NO: 241 CD40

AAGAAAGTTGCAAAGAAACCCACAAATAAAGCCCCACACCCTAAACAGGAACCC
CAAGAAATCAATTTCCCAGATGATCTCCCTGGATCTAATACTGCCGCCCCGGTC
CAAGAAACCCTGCATGGTTGCCAGCCTGTCACCCAAGAGGACGGAAAAGAATC
ACGGATTAGCGTACAAGAGAGACAA

SEQ ID NO: 242 CD40

KKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRI SVQERQ

SEQ ID NO: 243 Enlazador
gcggccgcagTCGAG

SEQ ID NO: 244 Enlazador
AAAVE

SEQ ID NO: 245 Cadena zeta de CD3

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGA ACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGG ACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAA CCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCT ACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGG CCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACAT GCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA

SEQ ID NO: 246 Cadena zeta de CD3

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL PPR*

Secuencias para SFG-Myr.MC-2A-CD19.scfv.CD34e.CD8stm.zeta
Secuencia de SFG-Myr.MC.2A.CD19scFv.CD34e.CD8stm.zeta

SEQ ID NO: 247 Miristoilación
atggggagtagcaagagcaagcctaaggaccccagccagcgc

SEQ ID NO: 248 Miristoilación
MGSSKSKPKDPSQR

SEQ ID NO: 249 Enlazador
ctcgac

SEQ ID NO: 250 Enlazador
LD

SEQ ID NO: 251 MyD88

atggctgcaggaggtcccggcgcggggtctgcggccccggtctcctccacatcctcccttcccctggctgctctcaaca tgcgagtgcggcgccgcctgtctctgttcttgaacgtgcggacacaggtggcggccgactggaccgcgctggcggag gagatggactttgagtacttggagatccggcaactggagacacaagcggaccccactggcaggctgctggacgcct ggcagggacgccctggcgcctctgtaggccgactgctcgatctgcttaccaagctgggccgcgacgacgtgctgctg gagctgggacccagcattgaggaggattgccaaaagtatatcttgaagcagcagcaggaggaggctgagaagcct ttacaggtggccgctgtagacagcagtgtcccacggacagcagagctggcgggcatcaccacacttgatgaccccc tggggcatatgcctgagcgtttcgatgccttcatctgctattgccccagcgacatc

SEQ ID NO:252 MyD88

MAAGGPGAGSAAPVSSTSSLPLAALNMRVRRRLSLFLNVRTQVAADWTALAEEMD
FEYLEIRQLETQADPTGRLLDAWQGRPGASVGRLLDLLTKLGRDDVLLELGPSIEED
CQKYILKQQQEEAEKPLQVAAVDSSVPRTAELAGITTLDDPLGHMPERFDAFICYCP
SDI

SEQ ID NO: 253 Enlazador
gtcgag

SEQ ID NO: 254 Enlazador
VE

SEQ ID NO: 255 CD40

aaaaaggtggccaagaagccaaccaataaggccccccaccccaagcaggagccccaggagatcaattttcccg
acgatcttcctggctccaacactgctgctccagtgcaggagactttacatggatgccaaccggtcacccaggaggatg
gcaaagagagtcgcatctcagtgcaggagagacag

SEQ ID NO: 256 CD40

KKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRI
SVQERQ

SEQ ID NO: 257 Enlazador
CCGCGG

SEQ ID NO: 258 Enlazador
PR

SEQ ID NO: 259 Secuencia de T2A

GAAGGCCGAGGGAGCCTGCTGACATGTGGCGATGTGGAGGAAAACCCAGGAC
CA

SEQ ID NO: 260 Secuencia de T2A
EGRGSLLTCGDVEENPGP

SEQ ID NO: 261 Péptido de señal

ATGGAGTTTGGACTTTCTTGGTTGTTTTTGGTGGCAATTCTGAAGGGTGTCCAGT
GTAGCAGG

SEQ ID NO: 262 *Péptido de señal*
MEFGLSWLFLVAILKGVQCSR

SEQ ID NO: 263 cadena ligera variable de FMC63

GACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGA
GTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAATTGGTATC
AGCAGAAACCAGATGGAACTGTTAAACTCCTGATCTACCATACATCAAGATTACA
CTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCT
CACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGG
TAATACGCTTCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACTAAGTTGGAAATAACA

SEQ ID NO: 264 cadena ligera variable de FMC63

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSG
VPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIT

SEQ ID NO: 265 Enlazador flexible
GGCGGAGGAAGCGGAGGTGGGGGC

SEQ ID NO: 266 Enlazador flexible
GGGSGGGG

SEQ ID NO: 267 Cadena pesada variable de FMC63

GAGGTGAAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCC
TGTCCGTCACATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAGCT
GGATTCGCCAGCCTCCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGT
AGTGAAACCACATACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGACCATCATCAAGG
ACAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACTGATGACAC
AGCCATTTACTACTGTGCCAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGAC
TACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 268 Cadena pesada variable de FMC63

EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSE
TTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWG
QGTSVTVSS

SEQ ID NO: 269 Enlazador
GGATCC

SEQ ID NO: 270 Enlazador
GS

SEQ ID NO: 271 Epítopo mínimo de CD34
GAACTTCCTACTCAGGGGACTTTCTCAAACGTTAGCACAAACGTAAGT

SEQ ID NO: 272 Epítopo mínimo de CD34
ELPTQGTFSNVSTNVS

SEQ ID NO: 273 Dominio de tallo de CD8 alfa

CCCGCCCCAAGACCCCCCACACCTGCGCCGACCATTGCTTCTCAACCCCTGAG
TTTGAGACCCGAGGCCTGCCGGCCAGCTGCCGGCGGGGCCGTGCATACAAGA
GGACTCGATTTCGCTTGCGAC

SEQ ID NO: 274 Dominio de tallo de CD8 alfa
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD

SEQ ID NO: 275 Dominio transmembrana de CD8 alfa

ATCTATATCTGGGCACCTCTCGCTGGCACCTGTGGAGTCCTTCTGCTCAGCCTG
GTTATTACTCTGTACTGTAATCACCGGAATCGCCGCCGCGTTTGTAAGTGTCCC
AGG

SEQ ID NO: 276 Dominio transmembrana de CD8 alfa
IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPR

SEQ ID NO: 277 Enlazador
GTCGAC

SEQ ID NO: 278 Enlazador
VD

SEQ ID NO: 279 CD3 zeta

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGA
ACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGG
ACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAA
CCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCT
ACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGG
CCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACAT
GCAGGCCCTGCCCCCTCGC

SEQ ID NO: 280 CD3 zeta

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP
QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL
PPR

SEQ ID NO: 281 (secuencia de nucleótidos de MyD88)

atggctgcaggaggtcccggcgcggggtctgcggccccggtctcctccacatcctcccttcccctggctgctctcaaca
tgcgagtgcggcgccgcctgtctctgttcttgaacgtgcggacacaggtggcggccgactggaccgcgctggcggag
gagatggactttgagtacttggagatccggcaactggagacacaagcggaccccactggcaggctgctggacgcct
ggcagggacgccctggcgcctctgtaggccgactgctcgagctgcttaccaagctgggccgcgacgacgtgctgctg
gagctgggacccagcattgaggaggattgccaaaagtatatcttgaagcagcagcaggaggaggctgagaagcct
ttacaggtggccgctgtagacagcagtgtcccacggacagcagagctggcgggcatcaccacacttgatgaccccc
tggggcatatgcctgagcgtttcgatgccttcatctgctattgccccagcgacatccagtttgtgcaggagatgatccggc
aactggaacagacaaactatcgactgaagttgtgtgtgtctgaccgcgatgtcctgcctggcacctgtgtctggtctattg
ctagtgagctcatcgaaaagaggtgccgccggatggtggtggttgtctctgatgattacctgcagagcaaggaatgtg
acttccagaccaaatttgcactcagcctctctccaggtgcccatcagaagcgactgatccccatcaagtacaaggcaa
tgaagaaagagttccccagcatcctgaggttcatcactgtctgcgactacaccaacccctgcaccaaatcttggttctg
gactcgccttgccaaggccttgtccctgccc

SEQ ID NO: 282 (secuencia de aminoácidos de MyD88)

MAAGGPGAGSAAPVSSTSSLPLAALNMRVRRRLSLFLNV
RTQVAADWTALAEEMDFEYLEIRQLETQADPTGRLLDAW
QGRPGASVGRLLELLTKLGRDDVLLELGPSIEEDCQKYIL
KQQQEEAEKPLQVAAVDSSVPRTAELAGITTLDDPLGHMP
ERFDAFICYCPSDIQFVQEMIRQLEQTNYRLKLCVSDRDV
LPGTCVWSIASELIEKRCRRMVVVVSDDYLQSKECDFQTK
FALSLSPGAHQKRLIPIKYKAMKKEFPSILRFITVCDYTNP
CTKSWFWTRLAKALSLP

Ejemplo 17: Desarrollo de interruptor dimérico en células terapéuticas mejorado

La terapia usando linfocitos T autólogos que expresan receptores de antígenos quiméricos (CAR) dirigidos contra antígenos asociados con tumores (TAA) ha tenido un efecto transformador en el tratamiento de ciertos tipos de leucemias ("tumores líquidos") y linfomas con tasas de respuesta objetivas (OR) que se aproximan al 90 %. A pesar de su gran promesa clínica y del predecible entusiasmo que lo acompaña, este éxito se ve modulado por el alto nivel observado de eventos adversos en la diana y fuera del tumor, típicos de un síndrome de liberación de citoquinas (CRS). Para mantener el beneficio de estos tratamientos revolucionarios a la vez que se minimiza el riesgo, se ha desarrollado un sistema de gen de suicidio a base de polipéptido de caspasa quimérico, que está basado en la dimerización mediada por ligando sintético de una proteína de Caspasa-9 modificada, fusionada a un dominio de unión a ligando, denominado FKBP12v36. En presencia de la unión de FKBP12v36 al dimerizador de molécula pequeña, rimiducid (AP1903), se activa la Caspasa-9, lo que da lugar a la rápida apoptosis de las células diana. La adición de niveles reducidos de rimiducid puede dar lugar a una tasa modulada de eliminación, permitiendo la regulación de la eliminación de linfocitos T de prácticamente nada a una eliminación prácticamente completa de los linfocitos T modificados con caspasa quimérica. Para maximizar la utilidad de este interruptor "más tenue", la pendiente de la curva de respuesta a la dosis debe ser tan gradual como sea posible; de otro modo, la administración de la dosis correcta es un reto. Con la primera generación actual de construcción de iCaspasa-9 clínica, se ha observado una curva de respuesta a la dosis que abarca de aproximadamente 1,5 a 2 log.

Para mejorar en la célula terapéutica la función del dímero, puede añadirse un segundo nivel de control a la agregación de Caspasa-9, separando los bajos niveles de agregación impulsados por rapamicina de los altos niveles de dimerización impulsados por rimiducid. En el primer nivel de control, se reclutan los polipéptidos de caspas quiméricos por rapamicina/sirolimus (o un análogo no inmunosupresor) a un receptor de antígeno quimérico (CAR), que se modifica para contener una o más copias del dominio de unión a rapamicina FKBP12 de 89 aminoácidos (codificado en mTOR) en su extremo carboxilo (Fig. 3, panel izquierdo). En relación con la homodimerización

impulsada por rimiducid de iCaspasa-9, se predice que el nivel de oligomerización de Caspasa-9 podría reducirse, tanto debido a las afinidades relativas de FKBP12v36 unido a rapamicina al FRB (K_d ~ 4 nM) frente a FKBP12v36 unido a rimiducid (~ 0,1 nM) y debido a la geometría "escalonada" de las proteínas reticuladas. Puede proporcionarse un nivel adicional de "refinado" en el sitio de acoplamiento del CAR cambiando el número de dominios FRB fusionados a cada CAR. Paralelamente, se proporcionará especificidad dependiente de la diana por el agrupamiento de CAR impulsado por diana normal, que debería, a su vez, traducirse en un agrupamiento de polipéptido de caspasa quimérico en presencia de rapamicina. Cuando se requiere un nivel máximo de eliminación celular, también puede administrarse rimiducid con el protocolo actual (es decir, en la actualidad 0,4 mg/kg en una infusión de 2 horas (Figura 3, panel derecho).

Métodos:

Vectores para polipéptido de caspasa quimérico regulados por rapálogo: El laboratorio Schreiber identificó inicialmente el dominio de unión a rapamicina de FKBP12 (FRB) de mTOR/FRAP (residuos 2025-2114), determinando que tiene una constante de disociación de rapamicina (Kd) de aproximadamente 4 nM (Chen J et al (95) PNAS 92, 4947-51). Estudios posteriores identificaron mutantes ortogonales de FRB, tales como FRBI (L2098) que se unen con afinidad relativamente elevada a análogos de rapamicina ("rapálogos") "enderezados" (Liberles SD (97) PNAS 94, 7825-30; Bayle JH (06) Chem & Biol 13, 99-107). Para desarrollar MC-CAR modificados que puedan reclutar un CaspaCIDa, el dominio carboxilo terminal de CD3 zeta (de pBP0526) y pBP0545, Figura 7) se fusionan a 1 o 2 dominios de FRB_L en tándem usando un fragmento sintetizado comercialmente de SalI-MluI que contiene dominios MyD88, CD40 y CD3ζ para producir los vectores pBP0612 y pBP0611, respectivamente (Figuras 4 y 5) y tablas 7 y 8. La estrategia también debe ser aplicable a cualquier construcción de CAR, incluyendo construcciones convencionales "no de MyD88/CD40", tales como aquellos que incluyen CD28, OX40 y/o 4-1BB y CD3zeta.

Resultados:

Como prueba de principio, se fusionaron dos dominios FRB en tándem a un Her2-CAR de 1.ª generación o a un CD19-CAR de 1.ª generación que coexpresan Caspasa-9 inducible. Las células 293 se transfectaron transitoriamente con un plásmido indicador constitutivo, SRα-SEAP, junto con niveles normalizados de plásmidos de expresión que codifican Her2-CAR-FRB|2, iCaspasa-9, Her2-CAR-FRB|2 + iCasp9, iC9-CAR(19).FRB|2 (que coexpresa tanto CD19-CAR-FRB|2 como iCaspasa9) o vector de control. Tras 24 horas, se lavaron las células y se distribuyeron en pocillos duplicados con diluciones semilogarítmicas de rapamicina o rimiducid. Tras la incubación durante una noche con fármacos, se determinó la actividad de SEAP. De forma interesante, la adición de rapamicina dio lugar a un amplio incremento de la actividad de SEAP hasta aproximadamente una reducción del 50 % (Figura 6). Esta reducción dependiente de la dosis requirió la presencia tanto del CAR marcado con FRB como de Caspasa-9 marcada con FKBP. Por el contrario, AP1903 redujo la actividad de SEAP en aproximadamente un 20 % de los niveles normales a niveles de fármaco mucho más bajos, comparable con la experiencia anterior. Igualmente, es posible reducir la viabilidad celular con rapamicina y cambiar a rimiducid para una eliminación *in vivo* más eficiente en caso necesario. Además, el agrupamiento de CAR mediado sobre o fuera de la diana debe aumentar la sensibilidad de la eliminación principalmente en el sitio de acoplamiento del scFv.

Permutaciones adicionales del hetero-interruptor:

Aunque se ha demostrado que la Caspasa-9 es el gen de suicidio más rápido y más sensible a CID ensayado entre una gran cohorte de moléculas de señalización inducible, muchas otras proteínas o dominios de proteína que dan lugar a la apoptosis (o la necroptosis relacionada, desencadenando inflamación y necrosis como medio de eliminación celular) podrían adaptarse a la eliminación basada en homo o heterodímero usando esta estrategia.

Una lista parcial de proteínas que podría activarse por reclutamiento mediado por rapamicina (o rapálogo) incluye:

Otras caspasas (es decir, caspasas 1 a 14, que se han identificado en mamíferos). Otras moléculas adaptadoras asociadas con Caspasa, tales como FADD (DED), APAF1 (CARD), CRADD/RAIDD (CARD) y ASC (CARD) que funcionan como dimerizadores de caspasa naturales (los dominios de dimerización están entre paréntesis).
Los miembros proapoptóticos de la familia de Bcl-2, tales como Bax y Bak, que pueden provocar despolarización mitocondrial (o la localización errónea de miembros de la familia antiapoptótica, como Bcl-xL o Bcl-2).
El dominio RIPK3 o RIPK1-RHIM que puede provocar una forma relacionada de muerte celular proinflamatoria, denominada necroptosis, debido a la lisis de la membrana mediada por MLKL.
Debido a su nivel de agregación dependiente de la diana, los receptores CAR deberían proporcionar sitios de acoplamiento ideales para el reclutamiento mediado por rapamicina de moléculas proapoptóticas. Sin embargo, existen muchos ejemplos de sitio de acoplamiento multivalentes que contienen dominios FRB que podrían proporcionar potencialmente muerte celular mediada por rapálogo en presencia de moléculas similares a caspasa inducible quiméricas coexpresadas.

TABLA 7: iCasp9-2A-ΔCD19-Q-CD28stm-MCz-FRBI2

Fragmento	Nucleótido	Polipéptido
FKBP12v36	ATGGGAGTGCAGGTGGAGACTATTAGCCCCGGAGATGGCAGAACATTC CCCAAAAGAGGACAGACTTGCGTCGTGCATTATACTGGAATGCTGGAA GACGGCAAGAAGGTGGACAGCAGCCGGGACCGAAACAAGCCCTTCAA GTTCATGCTGGGGAAGCAGGAAGTGATCCGGGGCTGGGAGGAAGGAG TCGCACAGATGTCAGTGGGACAGAGGCCAAACTGACTATTAGCCCAG ACTACGCTTATGGAGCAACCGGCCACCCCGGGATCATTCCCCCTCATG CTACACTGGTCTTCGATGTGGAGCTGCTGAAGCTGGAA	MGVQVETISPGDGRTFPKRGQTC VVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKP FKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSV GQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPP HATLVFDVELLKLE
Enlazador	AGCGGAGGAGGATCCGGA	SGGGSG
ΔCaspasa-9	GTGGACGGGTTTGGAGATGTGGGAGCCCTGGAATCCCTGCGGGGCAA TGCCGATCTGGCTTACATCCTGTCTATGGAGCCTTGCGGCCACTGTCT GATCATTAACAATGTGAACTTCTGCAGAGAGAGCGGGCTGCGGACCAG AACAGGATCCAATATTGACTGTGAAAAGCTGCGGAGAAGGTTCTCTAGT CTGCACTTTATGGTCGAGGTGAAAGGCGATCTGACCGCTAAGAAATG GTGCTGGCCCTGCTGGAACTGGCTCGGCAGGACCATGGGGCACTGGA TTGCTGCGTGGTCGTGATCCTGAGTCACGGCTGCCAGGCTTCACATCT GCAGTTCCCTGGGGCAGTCTATGGAACTGACGGCTGTCCAGTCAGCGT GGAGAAGATCGTGAACATCTTCAACGGCACCTCTTGCCCAAGTCTGGG CGGGAAGCCCAAACTGTTCTTTATTCAGGCCTGTGGAGGCGAGCAGAA AGATCACGGCTTCGAAGTGGCTAGCACCTCCCCCGAGGACGAATCACC TGGAAGCAACCCTGAGCCAGATGCAACCCCCTTCCAGGAAGGCCTGAG GACATTTGACCAGCTGGATGCCATCTCAAGCCTGCCCACACCTTCTGAC ATTTTCGTCTCTTACAGTACTTTCCCTGGATTTGTGAGCTGGCGCGATC CAAAGTCAGGCAGCTGGTACGTGGAGACACTGGACGATATCTTTGAGC AGTGGGCCCATTCTGAAGACCTGCAGAGTCTGCTGCTGCGAGTGGCCA ATGCTGTCTCTGTGAAGGGATCTACAAACAGATGCCAGGATGCTTCAA CTTTCTGAGAAAGAAACTGTTCTTTAAGACCTCCGCATCTAGGGCC	VDGFGDVGALESLRGNADLAYILS MEPCGHCLIINNVNFCRESGLRTR TGSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEVK GDLTAKKMVLALLELARQDHGALD CCVVVILSHGCQASHLQFPGAVY GTDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSL GGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEV ASTSPEDESPGSNPEPDATPFQE GLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYS TFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDD IFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSV KGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTSA SRA **SEQ ID NO: 300**
Enlazador	CCGCGG	PR
T2A	GAAGGCCGAGGGAGCCTGCTGACATGTGGCGATGTGGAGGAAAACCC AGGACCA	EGRGSLLTCGDVEENPGP
Enlazador (NcoI)	Ccatgg	PW

(continuación)

Fragmento	Nucleótido	Polipéptido
Péptido de señal	ATGGAGTTTGGACTTTCTTGGTTGTTTTTGGTGGCAATTCTGAAGGGTG TCCAGTGTAGCAGG	MEFGLSWLFLVAILKGVQCSR
FMC63-VL	GACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTGGGA GACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATT TAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACTGTTAAACTCCTGATCTA CCATACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGT GGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAG ATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCGTACACGTT CGGAGGGGGGGACTAAGTTGGAAATAACA	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCR ASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLI YHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDY SLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPY TFGGGTKLEIT
Enlazador flexible	GGCGGAGGAAGCGGAGGTGGGGGC	GGGSGGGG
FMC63-VH	GAGGTGAAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACA GAGCCTGTCCGTCACATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTAT GGTGTAAGCTGGATTCGCCAGCCTCCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTG GGAGTAATATGGGGTAGTGAAACCACATACTATAATTCAGCTCTCAAAT CCAGACTGACCATCATCAAGGACAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAA AATGAACAGTCTGCAAACTGATGACACAGCCATTTACTACTGTGCCAAA CATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAA CCTCAGTCACCGTCTCCTCA	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTV SGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEW LGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKD NSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCA KHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTV SS
Enlazador (BamHI)	GGATCC	GS
Epítopo de CD34	GAACTTCCTACTCAGGGGACTTTCTCAAACGTTAGCACAAACGTAAGT	ELPTQGTFSNVSTNVS
Tallo de CD8a	CCCGCCCCAAGACCCCCCACACCTGCGCCGACCATTGCTTCTCAACCC CTGAGTTTGAGACCCGAGGCCTGCCGGCCAGCTGCCGGCGGGGGCCGT GCATACAAGAGGACTCGATTTCGCTTGCGAC	PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC RPAAGGAVHTRGLDFACD
CD8tm + tf de parada	ATCTATATCTGGGCACCTCTCGCTGGCACCTGTGGAGTCCTTCTGCTCA GCCTGGTTATTACTCTGTACTGTAATCACCGGAATCGCCGCCGCGTTTG TAAGTGTCCCAGG	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCN HRNRRRVCKCPR
Enlazador (SalI)	gtcgac	VD

(continuación)

Fragmento	Nucleótido	Polipéptido
MyD88	ATGGCCGCTGGGGGCCCAGGCGCCGGATCAGCTGCTCCCGTATCTTC TACTTCTTCTTTGCCGCTGGCTGCTCTGAACATGCGCGTGAGAAGACG CCTCTCCCTGTTCCTTAACGTTCGCACACAAGTCGCTGCCGATTGGACC GCCCTTGCCGAAGAAATGGACTTTGAATACCTGGAAATTAGACAACTTG AAACACAGGCCGACCCCACTGGCAGACTCCTGGACGCATGGCAGGGA AGACCTGGTGCAAGCGTTGGACGGCTCCTGGATCTCCTGACAAAACTG GGACGCGACGACGTACTGCTTGAACTCGGACCTAGCATTGAAGAAGAC TGCCAAAAATATATCCTGAAACAACAACAAGAAGAAGCCGAAAAACCTC TCCAAGTCGCAGCAGTGGACTCATCAGTACCCCGAACAGCTGAGCTTG CTGGGATTACTACACTCGACGACCCACTCGGACATATGCCTGAAAGATT CGACGCTTTCATTTGCTATTGCCCCTCTGACATA	MAAGGPGAGSAAPVSSTSSLPLA ALNMRVRRRLSLFLNVRTQVAAD WTALAEEMDFEYLEIRQLETQADP TGRLLDAWQGRPGASVGRLLDLL TKLGRDDVLLELGPSIEEDCQKYIL KQQQEEAEKPLQVAAVDSSVPRT AELAGITTLDDPLGHMPERFDAFIC YCPSDI
dCD40	AAGAAAGTTGCAAAGAAACCCACAAATAAAGCCCCACACCCTAAACAGG AACCCCAAGAAATCAATTTCCCAGATGATCTCCCTGGATCTAATACTGC CGCCCCGGTCCAAGAAACCCTGCATGGTTGCCAGCCTGTCACCCAAGA GGACGGAAAAGAATCACGGATTAGCGTACAAGAGAGACAA	KKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFP DDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVT QEDGKESRISVQERQ
CD3z	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGG CCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTA CGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAA AGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGA AAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGC GCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACA GCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAAGCTCTTCCACCT CGt	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQG LSTATKDTYDALHMQALPPR
Enlazador	Acg	T
FRBI^^	TGGCACGAAGGCCTGGAAGAGGCCTCAAGACTTTACTTTGGTGAACGC AACGTTAAAGGCATGTTCGAGGTGCTGGAACCCTTGCATGCAATGATG GAGCGAGGTCCTCAGACACTCAAAGAGACATCTTTTAACCAGGCGTAT GGACGGGACCTCATGGAGGCTCAGGAATGGTGCCGCAAGTACATGAAA AGTGGGAATGTGAAGGATCTGCTGCAAGCATGGGATCTGTATTACCAC GTGTTTAGACGGATCAGCAAA	WHEGLEEASRLYFGERNVKGMFE VLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQ AYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNV KDLLQAWDLYYHVFRRISK
Enlazador (BsiWI)	Cgtacg	RT
FRBI	TGGCATGAAGGGTTGGAAGAAGCTTCAAGGCTGTACTTCGGAGAGAGG AACGTGAAGGGCATGTTTGAGGTTCTTGAACCTCTGCACGCCATGATG GAACGGGGACCGCAGACACTGAAAGAAACCTCTTTTAATCAGGCCTAC GGCAGAGACCTGATGGAGGCCCAAGAATGGTGTAGAAAGTATATGAAA TCCGGTAACGTGAAAGACCTGCTCCAGGCCTGGGACCTTTATTACCAT GTGTTCAGGCGGATCAGTAAGTAA	WHEGLEEASRLYFGERNVKGMFE VLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQ AYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNV KDLLQAWDLYYHVFRRISK*

TABLA 8

Fragmento	Nucleótido	Polipéptido
FKBP12v36	ATGGGAGTGCAGGTGGAGACTATTAGCCCCGGAGATGGCAGAACATTC CCCAAAAGAGGACAGACTTGCGTCGTGCATTATACTGGAATGCTGGAA GACGGCAAGAAGGTGGACAGCAGCCGGGACCGAAACAAGCCCTTCAA GTTCATGCTGGGGAAGCAGGAAGTGATCCGGGGCTGGGAGGAAGGAG TCGCACAGATGTCAGTGGGACAGAGGGCCAAACTGACTATTAGCCCAG ACTACGCTTATGGAGCAACCGGCCACCCCGGGATCATTCCCCCTCATG CTACACTGGTCTTCGATGTGGAGCTGCTGAAGCTGGAA	MGVQVETISPGDGRTFPKRGQTC VVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKP FKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSV GQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPP HATLVFDVELLKLE
Enlazador	AGCGGAGGAGGATCCGGA	SGGGSG
dCaspase9	GTGGACGGGTTTGGAGATGTGGGAGCCCTGGAATCCCTGCGGGGCAA TGCCGATCTGGCTTACATCCTGTCTATGGAGCCTTGCGGCCACTGTCT GATCATTAACAATGTGAACTTCTGCAGAGAGAGCGGGCTGCGGACCAG AACAGGATCCAATATTGACTGTGAAAAGCTGCGGAGAAGGTTCTCTAGT CTGCACTTTATGGTCGAGGTGAAAGGCGATCTGACCGCTAAGAAAATG GTGCTGGCCCTGCTGGAACTGGCTCGGCAGGACCATGGGGCACTGGA TTGCTGCGTGGTCGTGATCCTGAGTCACGGCTGCCAGGCTTCACATCT GCAGTTCCCTGGGGCAGTCTATGGAACTGACGGCTGTCCAGTCAGCGT GGAGAAGATCGTGAACATCTTCAACGGCACCTCTTGCCCAAGTCTGGG CGGGAAGCCCAAACTGTTCTTTATTCAGGCCTGTGGAGGCGAGCAGAA AGATCACGGCTTCGAAGTGGCTAGCACCTCCCCCGAGGACGAATCACC TGGAAGCAACCCTGAGCCAGATGCAACCCCCTTCCAGGAAGGCCTGAG GACATTTGACCAGCTGGATGCCATCTCAAGCCTGCCCACACCTTCTGAC ATTTTCGTCTCTTACAGTACTTTCCCTGGATTTGTGAGCTGGCGCGATC CAAAGTCAGGCAGCTGGTACGTGGAGACACTGGACGATATCTTTGAGC AGTGGGCCCATTCTGAAGACCTGCAGAGTCTGCTGCTGCGAGTGGCCA ATGCTGTCTCTGTGAAGGGGATCTACAAACAGATGCCAGGATGCTTCAA CTTTCTGAGAAAGAAACTGTTCTTTAAGACCTCCGCATCTAGGGCC	VDGFGDVGALESLRGNADLAYILS MEPCGHCLIINNVNFCRESGLRTR TGSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEVK GDLTAKKMVLALLELARQDHGALD CCVVVILSHGCQASHLQFPGAVY GTDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSL GGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEV ASTSPEDESPGSNPEPDATPFQE GLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYS TFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDD IFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSV KGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTSA SRA
Enlazador (SacII)	CCGCGG	PR
T2A	GAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATCC CGGGCCC	EGRGSLLTCGDVEENPGP
Enlazador (NcoI)	GCATGCGCCACC	ACAT

(continuación)

Fragmento	Nucleótido	Polipéptido
Péptido de señal	ATGGAGTTTGGGTTGTCATGGTTGTTTCTCGTCGCTATTCTCAAAGGTG TACAATGCTCCCGC	MEFGLSWLFLVAILKGVQCSR
FRP5-VH	GAAGTCCAATTGCAACAGTCAGGCCCCGAATTGAAAAAGCCCGGCGAA ACAGTGAAGATATCTTGTAAAGCCTCCGGTTACCCTTTTACGAACTATG GAATGAACTGGGTCAAACAAGCCCCTGGACAGGGATTGAAGTGGATGG GATGGATCAATACATCAACAGGCGAGTCTACCTTCGCAGATGATTTCAA AGGTCGCTTTGACTTCTCACTGGAGACCAGTGCAAATACCGCCTACCTT CAGATTAACAATCTTAAAAGCGAGGATATGGCAACCTACTTTTGCGCAA GATGGGAAGTTTATCACGGGTACGTGCCATACTGGGGACAAGGAACGA CAGTGACAGTTAGTAGC	EVQLQQSGPELKKPGETVKISCKA SGYPFTNYGMNWVKQAPGQGLK WMGWINTSTGESTFADDFKGRFD FSLETSANTAYLQINNLKSEDMAT YFCARWEVYHGYVPYWGQGTTV TVSS
Enlazador flexible	GGCGGTGGAGGCTCCGGTGGAGGCGGCTCTGGAGGAGGAGGTTCA	GGGGSGGGGSGGGGS
FRP5VL	GACATCCAATTGACACAATCACACAAATTTCTCTCAACTTCTGTAGGAGA CAGAGTGAGCATAACCTGCAAAGCATCCCAGGACGTGTACAATGCTGT GGCTTGGTACCAACAGAAGCCTGGACAATCCCCAAAATTGCTGATTTAT TCTGCCTCTAGTAGGTACACTGGGGTACCTTCTCGGTTTACGGGCTCTG GGTCCGGACCAGATTTCACGTTCACAATCAGTTCCGTTCAAGCTGAAGA CCTCGCTGTTTATTTTTGCCAGCAGCACTTCCGAACCCCTTTTACTTTTG GCTCAGGCACTAAGTTGGAAATCAAGGCTTTG	DIQLTQSHKFLSTSVGDRVSITCKA SQDVYNAVAWYQQKPGQSPKLLI YSASSRYTGVPSRFTGSGSGPDF TFTISSVQAEDLAVYFCQQHFRTP FTFGSGTKLEIKAL
Enlazador (NsiI)	Atgcat	MH
Epítopo de CD34	GAACTTCCTACTCAGGGGACTTTCTCAAACGTTAGCACAAACGTAAGT	ELPTQGTFSNVSTNVS
Tallo de CD8a	CCCGCCCCAAGACCCCCCACACCTGCGCCGACCATTGCTTCTCAACCC CTGAGTTTGAGACCCGAGGCCTGCCGGCCAGCTGCCGGCGGGGCCGT GCATACAAGAGGACTCGATTTCGCTTGCGAC	PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC RPAAGGAVHTRGLDFACD
CD8tm + tf de parada	ATCTATATCTGGGCACCTCTCGCTGGCACCTGTGGAGTCCTTCTGCTCA GCCTGGTTATTACTCTGTACTGTAATCACCGGAATCGCCGCCGCGTTTG TAAGTGTCCCAGG	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCN HRNRRRVCKCPR

(continuación)

Fragmento	Nucleótido	Polipéptido
Enlazador (Sail)	gtcgac	VD
MyD88	ATGGCCGCTGGGGGCCCAGGCGCCGGATCAGCTGCTCCCGTATCTTC TACTTCTTCTTTGCCGCTGGCTGCTCTGAACATGCGCGTGAGAAGACG CCTCTCCCTGTTCCTTAACGTTCGCACACAAGTCGCTGCCGATTGGACC GCCCTTGCCGAAGAAATGGACTTTGAATACCTGGAAATTAGACAACTTG AAACACAGGCCGACCCCACTGGCAGACTCCTGGACGCATGGCAGGGA AGACCTGGTGCAAGCGTTGGACGGCTCCTGGATCTCCTGACAAAACTG GGACGCGACGACGTACTGCTTGAACTCGGACCTAGCATTGAAGAAGAC TGCCAAAAATATATCCTGAAACAACAACAAGAAGAAGCCGAAAAACCTC TCCAAGTCGCAGCAGTGGACTCATCAGTACCCCGAACAGCTGAGCTTG CTGGGATTACTACACTCGACGACCCACTCGGACATATGCCTGAAAGATT CGACGCTTTCATTTGCTATTGCCCCTCTGACATA	MAAGGPGAGSAAPVSSTSSLPLA ALNMRVRRRLSLFLNVRTQVAAD WTALAEEMDFEYLEIRQLETQADP TGRLLDAWQGRPGASVGRLLDLL TKLGRDDVLLELGPSIEEDCQKYIL KQQQEEAEKPLQVAAVDSSVPRT AELAGITTLDDPLGHMPERFDAFIC YCPSDI
dCD40	AAGAAAGTTGCAAAGAAACCCACAAATAAAGCCCCACACCCTAAACAGG AACCCCAAGAAATCAATTTCCCAGATGATCTCCCTGGATCTAATACTGC CGCCCCGGTCCAAGAAACCCTGCATGGTTGCCAGCCTGTCACCCAAGA GGACGGAAAAGAATCACGGATTAGCGTACAAGAGAGACAA	KKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFP DDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVT QEDGKESRISVQERQ
CD3z	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGG CCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTA CGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAA AGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGA AAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGC GCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACA GCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAAGCTCTTCCACCT CGt	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQG LSTATKDTYDALHMQALPPR
Enlazador	Acg	T
FRBI^^	TGGCACGAAGGCCTGGAAGAGGCCTCAAGACTTTACTTTGGTGAACGC AACGTTAAAGGCATGTTCGAGGTGCTGGAACCCTTGCATGCAATGATG GAGCGAGGTCCTCAGACACTCAAAGAGACATCTTTTAACCAGGCGTAT GGACGGGACCTCATGGAGGCTCAGGAATGGTGCCGCAAGTACATGAAA AGTGGGAATGTGAAGGATCTGCTGCAAGCATGGGATCTGTATTACCAC GTGTTTAGACGGATCAGCAAA	WHEGLEEASRLYFGERNVKGMFE VLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQ AYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNV KDLLQAWDLYYHVFRRISK

(continuación)

Fragmento	Nucleótido	Polipéptido
Enlazador (BsiWI)	Cgtacg	RT
FRBI	TGGCATGAAGGGTTGGAAGAAGCTTCAAGGCTGTACTTCGGAGAGAGG AACGTGAAGGGCATGTTTGAGGTTCTTGAACCTCTGCACGCCATGATG GAACGGGGACCGCAGACACTGAAAGAAACCTCTTTTAATCAGGCCTAC GGCAGAGACCTGATGGAGGCCCAAGAATGGTGTAGAAAGTATATGAAA TCCGGTAACGTGAAAGACCTGCTCCAGGCCTGGGACCTTTATTACCAT GTGTTCAGGCGGATCAGTAAGTAA	WHEGLEEASRLYFGERNVKGMFE VLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQ AYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNV KDLLQAWDLYYHVFRRISK*

Tabla 9 pBP0545.pSFG.iCasp9.2A.Her2scFv.Q.CD8stm.MC-zeta

Fragmento	Nucleótido	Polipéptido
Kozak (secuencia de unión a ribosoma)	GCCACC	N/A
FKBP12v36	ATGGGAGTGCAGGTGGAGACTATTAGCCCCGGAGATGGCAGAACATTC CCCAAAAGAGGACAGACTTGCGTCGTGCATTATACTGGAATGCTGGAA GACGGCAAGAAGGTGGACAGCAGCCGGGACCGAAACAAGCCCTTCAA GTTCATGCTGGGGAAGCAGGAAGTGATCCGGGGCTGGGAGGAAGGAG TCGCACAGATGTCAGTGGGACAGAGGGCCAAACTGACTATTAGCCCAG ACTACGCTTATGGAGCAACCGGCCACCCCGGGATCATTCCCCCTCATG CTACACTGGTCTTCGATGTGGAGCTGCTGAAGCTGGAA	MGVQVETISPGDGRTFPKRGQTC VVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKP FKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSV GQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPP HATLVFDVELLKLE
Enlazador	AGCGGAGGAGGATCCGGA	SGGGSG
ΔCaspasa9	GTGGACGGGTTTGGAGATGTGGGAGCCCTGGAATCCCTGCGGGGCAA TGCCGATCTGGCTTACATCCTGTCTATGGAGCCTTGCGGCCACTGTCT GATCATTAACAATGTGAACTTCTGCAGAGAGAGCGGGCTGCGGACCAG AACAGGATCCAATATTGACTGTGAAAAGCTGCGGAGAAGGTTCTCTAGT CTGCACTTTATGGTCGAGGTGAAAGGCGATCTGACCGCTAAGAAAATG GTGCTGGCCCTGCTGGAACTGGCTCGGCAGGACCATGGGGCACTGGA TTGCTGCGTGGTCGTGATCCTGAGTCACGGCTGCCAGGCTTCACATCT GCAGTTCCCTGGGGCAGTCTATGGAACTGACGGCTGTCCAGTCAGCGT GGAGAAGATCGTGAACATCTTCAACGGCACCTCTTGCCCAAGTCTGGG CGGGAAGCCCAAACTGTTCTTTATTCAGGCCTGTGGAGGCGAGCAGAA AGATCACGGCTTCGAAGTGGCTAGCACCTCCCCCGAGGACGAATCACC TGGAAGCAACCCTGAGCCAGATGCAACCCCCTTCCAGGAAGGCCTGAG GACATTTGACCAGCTGGATGCCATCTCAAGCCTGCCCACACCTTCTGAC ATTTTCGTCTCTTACAGTACTTTCCCTGGATTTGTGAGCTGGCGCGATC CAAAGTCAGGCAGCTGGTACGTGGAGACACTGGACGATATCTTTGAGC AGTGGGCCCATTCTGAAGACCTGCAGAGTCTGCTGCTGCGAGTGGCCA ATGCTGTCTCTGTGAAGGGGATCTACAAACAGATGCCAGGATGCTTCAA CTTTCTGAGAAAGAAACTGTTCTTTAAGACCTCCGCATCTAGGGCC	VDGFGDVGALESLRGNADLAYILS MEPCGHCLIINNVNFCRESGLRTR TGSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEVK GDLTAKKMVLALLELARQDHGALD CCVVVILSHGCQASHLQFPGAVY GTDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSL GGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEV ASTSPEDESPGSNPEPDATPFQE GLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYS TFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDD IFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSV KGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTSA SRA
Enlazador (SacII)	CCGCGG	PR
T2A	GAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATCC CGGGCCC	EGRGSLLTCGDVEENPGP
Enlazador (NcoI)	GCATGCGCCACC	ACAT

(continuación)

Fragmento	Nucleótido	Polipéptido
Péptido de señal	ATGGAGTTTGGGTTGTCATGGTTGTTTCTCGTCGCTATTCTCAAAGGTG TACAATGCTCCCGC	MEFGLSWLFLVAILKGVQCSR
FRP5-VH (anti-Her2)	GAAGTCCAATTGCAACAGTCAGGCCCCGAATTGAAAAAGCCCGGCGAA ACAGTGAAGATATCTTGTAAAGCCTCCGGTTACCCTTTTACGAACTATG GAATGAACTGGGTCAAACAAGCCCCTGGACAGGGATTGAAGTGGATGG GATGGATCAATACATCAACAGCCGAGTCTACCTTCGCAGATGATTTCAA AGGTCGCTTTGACTTCTCACTGGAGACCAGTGCAAATACCGCCTACCTT CAGATTAACAATCTTAAAAGCGAGGATATGGCAACCTACTTTTGCGCAA GATGGGAAGTTTATCACGGGTACGTGCCATACTGGGGACAAGGAACGA CAGTGACAGTTAGTAGC	EVQLQQSGPELKKPGETVKISCKA SGYPFTNYGMNWVKQAPGQGLK WMGWINTSTGESTFADDFKGRFD FSLETSANTAYLQINNLKSEDMAT YFCARWEVYHGYVPYWGQGTTV TVSS
Enlazador flexible	GGCGGTGGAGGCTCCGGTGGAGGCGGCTCTGGAGGAGGAGGTTCA	GGGGSGGGGSGGGS
FRP5VL (anti-Her2)	GACATCCAATTGACACAATCACACAAATTTCTCTCAACTTCTGTAGGAGA CAGAGTGAGCATAACCTGCAAAGCATCCCAGGACGTGTACAATGCTGT GGCTTGGTACCAACAGAAGCCTGGACAATCCCCAAAATTGCTGATTTAT TCTGCCTCTAGTAGGTACACTGGGGTACCTTCTCGGTTTACGGGCTCTG GGTCCGGACCAGATTTCACGTTCACAATCAGTTCCGTTCAAGCTGAAGA CCTCGCTGTTTATTTTTGCCAGCAGCACTTCCGAACCCCTTTTACTTTTG GCTCAGGCACTAAGTTGGAAATCAAGGCTTTG	DIQLTQSHKFLSTSVGDRVSITCKA SQDVYNAVAWYQQKPGQSPKLLI YSASSRYTGVPSRFTGSGSGPDF TFTISSVQAEDLAVYFCQQHFRTP FTFGSGTKLEIKAL
Enlazador (NsiI)	Atgcat	MH
Epítopo de CD34	GAACTTCCTACTCAGGGGACTTTCTCAAACGTTAGCACAAACGTAAGT	ELPTQGTFSNVSTNVS
Tallo de CD8a	CCCGCCCCAAGACCCCCCACACCTGCGCCGACCATTGCTTCTCAACCC CTGAGTTTGAGACCCGAGGCCTGCCGGCCAGCTGCCGGCGGGGCCGT GCATACAAGAGGACTCGATTTCGCTTGCGAC	PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC RPAAGGAVHTRGLDFACD
CD8tm + tf de parada	ATCTATATCTGGGCACCTCTCGCTGGCACCTGTGGAGTCCTTCTGCTCA GCCTGGTTATTACTCTGTACTGTAATCACCGGAATCGCCGCCGCGCGTTTG TAAGTGTCCCAGG	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCN HRNRRRVCKCPR

(continuación)

Fragmento	Nucleótido	Polipéptido
Enlazador (Sail)	gtcgac	VD
MyD88	ATGGCCGCTGGGGGCCCAGGCGCCGGATCAGCTGCTCCCGTATCTTC TACTTCTTCTTTGCCGCTGGCTGCTCTGAACATGCGCGTGAGAAGACG CCTCTCCCTGTTCCTTAACGTTCGCACACAAGTCGCTGCCGATTGGACC GCCCTTGCCGAAGAAATGGACTTTGAATACCTGGAAATTAGACAACTTG AAACACAGGCCGACCCCACTGGCAGACTCCTGGACGCATGGCAGGGA AGACCTGGTGCAAGCGTTGGACGGCTCCTGGATCTCCTGACAAAACTG GGACGCGACGACGTACTGCTTGAACTCGGACCTAGCATTGAAGAAGAC TGCCAAAAATATATCCTGAAACAACAACAAGAAGAAGCCGAAAAACCTC TCCAAGTCGCAGCAGTGGACTCATCAGTACCCCGAACAGCTGAGCTTG CTGGGATTACTACACTCGACGACCCACTCGGACATATGCCTGAAAGATT CGACGCTTTCATTTGCTATTGCCCCTCTGACATA	MAAGGPGAGSAAPVSSTSSLPLA ALNMRVRRRLSLFLNVRTQVAAD WTALAEEMDFEYLEIRQLETQADP TGRLLDAWQGRPGASVGRLLDLL TKLGRDDVLLELGPSIEEDCQKYIL KQQQEEAEKPLQVAAVDSSVPRT AELAGITTLDDPLGHMPERFDAFIC YCPSDI
dCD40	AAGAAAGTTGCAAAGAAACCCACAAATAAAGCCCCACACCCTAAACAGG AACCCCAAGAAATCAATTTCCCAGATGATCTCCCTGGATCTAATACTGC CGCCCCGGTCCAAGAAACCCTGCATGGTTGCCAGCCTGTCACCCAAGA GGACGGAAAAGAATCACGGATTAGCGTACAAGAGACAA	KKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFP DDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVT QEDGKESRISVQERQ
CD3z	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGG CCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTA CGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAA AGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGA AAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGC GCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACA GCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAAGCTCTTCCACCT CGTtga	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQG LSTATKDTYDALHMQALPPR*

Los métodos analizados en el presente documento, incluyendo, pero sin limitación, métodos para construir vectores, ensayos de actividad o función, administración a pacientes, transfección o transformación de células, ensayo y métodos para controlar a pacientes también pueden encontrarse en las siguientes patentes y solicitudes de patente.

Solicitud de Patente de los Estados Unidos con n.º de serie 14/210.034, titulada METHODS FOR CONTROLLING T CELL PROLIFERATION, presentada el 13 de marzo de 2014; Solicitud de Patente de los Estados Unidos con n.º de serie 13/112.739, presentada el 20 de mayo de 2011, , concedida como la Patente de los Estados Unidos 9.089.520, 28 de julio de 2015 y titulada METHODS FOR INDUCING SELECTIVE APOPTOSIS; Solicitud de Patente de los Estados Unidos con n.º de serie 14/622.018, presentada el 13 de febrero de 2014, titulada METHODS FOR ACTIVATING T CELLS USING AN INDUCIBLE CHIMERIC POLYPEPTIDE; Solicitud de Patente de los Estados Unidos con n.º de serie 13/112.739, presentada el 20 de mayo de 2011, titulada METHODS FOR INDUCING SELECTIVE APOPTOSIS; Solicitud de Patente de los Estados Unidos con n.º de serie 13/792.135, presentada el 10 de marzo de 2013, titulada MODIFIED CASPASE POLYPEPTIDES AND USES THEREOF; Solicitud de Patente de los Estados Unidos con n.º de serie 14/296.404, presentada el 4 de junio de 2014, titulada METHODS FOR INDUCING PARTIAL APOPTOSIS USING CASPASE POLYPEPTIDES; Solicitud Provisional de Patente de los Estados Unidos con n.º de serie 62/044.885, presentada el 2 de septiembre de 2014 y Solicitud de Patente de los Estados Unidos 14/842.710, presentada el 1 de septiembre de 2015, cada una titulada COSTIMULATION OF CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS BY MyD88 AND CD40 POLYPEPTIDES; Solicitud de Patente de los Estados Unidos con n.º de serie 14/640.554, presentada el 6 de marzo de 2015, titulada CASPASE POLYPEPTIDES HAVING MODIFIED ACTIVITY AND USES THEREOF; Patente de los Estados Unidos número 7.404.950, concedida el 29 de junio de 2008, a Spencer, D. et al., Solicitud de Patente de los Estados Unidos 12/445.939 de Spencer, D., et al., presentada el 26 de octubre de 2010; Solicitud de Patente de los Estados Unidos 12/563.991 de Spencer, D., et al., presentada el 21 de septiembre de 2009; 13/087.329 de Slawin, K., et al., presentada el 14 de abril de 2011; 13/763.591 de Spencer, D., et al., presentada el 8 de febrero de 2013; y la Solicitud de Patente Internacional número PCT/US2014/022004, presentada el 7 de marzo de 2014, publicada como PCT/US2014/022004 el 9 de octubre de 2014, titulada MODIFIED CASPASE POLYPEPTIDES AND USES THEREOF.

Ejemplo 18: Ensamblaje de armazón a base de FRB y activación de iCaspasa-9.

Para determinar si podría agregarse iCaspasa-9 mediante multímeros en tándem de FRB_L, se subclonaron de una a cuatro copias en tándem de FRB_I en un vector de expresión, pSH1, que dirige la expresión del transgén a partir de un promotor de SRa. Un subconjunto de construcciones también contenía el dominio de direccionamiento de miristoilación de v-Src para la localización en la membrana del armazón de FRB (Fig. 12A). Se transfectaron células 293 con el plásmido indicador de SRα-SEAP junto con FKBP12-ΔCaspasa-9 (iCaspasa-9/CaspaCIDa), más 1 de varias proteínas de armazón no miristoiladas a base de FRB que contenían 0, 1 o 4 copias en tándem de FRB_I. La adición de rapamicina o análogo, C7-isopropoxi-rapamicina, creado mediante el método de Luengo et al., (Luengo JI (95) Chem & Biol 2, 471-81. Luengo JI (94) J. Org Chem 59: 6512-13), dio lugar a una disminución de la actividad indicadora cuando estaba presente la construcción 4x FRB, lo que es coherente con la muerte celular, como se había predicho (Fig. 8B, 10D, 10E) con una CI_{50} ~ 3 nM (Fig. 12B). La adición de rapamicina no tuvo efecto en la actividad indicadora cuando solo había presente 1 (o 0) dominio FRB, lo que podría impedir la oligomerización de iCasp9 (Fig. 10C). Se obtuvieron resultados similares cuando se miristoiló el armazón de FRB (Fig. 12C) para localizar el armazón a la membrana plasmática. Por lo tanto, puede activarse el polipéptido de Caspasa-9 con rapamicina o análogos cuando se oligomeriza en un armazón a base de FRB.

Ejemplo 19: Los armazones a base de FKBP12 se ensamblan y activan a FRB-ΔCaspasa-9.

Para determinar si podía revertirse la polaridad de la heterodimerización y el ensamblaje de Caspasa-9, se subclonaron de 1 a 4 copias en tándem de FKBP12 en el vector de expresión, pSH1, como anteriormente. (Fig. 13A). Como anteriormente, Se transfectaron células 293 con el plásmido indicador de SRα-SEAP junto con FRBL-ΔCaspasa-9, más una proteína de armazón no miristoilada que contenía 1 o 4 copias en tándem de FKBP12. La adición de rapamicina o análogo, C7-isopropoxi-rapamicina, dio lugar a una disminución de la actividad indicadora cuando estaba presente la construcción 4x FRB_L, lo que es coherente con la muerte celular con una CI_{50} ~ 3 nM (Fig. 13B). La adición de rapamicina no tuvo efecto en la actividad indicadora cuando solo había presente 1 (o 0) dominio FKBP, similar a los resultados en la Fig. 12. Por lo tanto, puede activarse la Caspasa-9 con rapamicina o análogos cuando se oligomeriza en un armazón a base de FRB o FKBP12.

Ejemplo 20: Ensamblaje de armazón a base de FRB y activación de iCaspasa-9 en linfocitos T primarios.

Para determinar si podría agregarse iCaspasa-9 mediante multímeros en tándem de FRB_L en linfocitos T primarios no transformados, se subclonaron de cero a 3 copias en tándem de FRBL en un vector de expresión retrovírico, pBP0220--pSFG-iC9.T2A-ΔCD19, que codifica Caspasa-9 (CaspaCIDa) junto con una versión truncada sin señalización de CD19 que servía como marcador de superficie. Los vectores plasmídicos unificados resultantes, denominados pBP0756-iC9.T2A-ΔCD19.P2A-FRB_L, pBP0755-iC9.T2A-ΔCD19.P2A-FRB_L2 y pBP0757-iC9.T2A-ΔCD19.P2A-FRB_L3, se usaron posteriormente para producir γ-retrovirus infecciosos (γ-RVs) que codifican armazones de 1, 2 o 3 dominios FRB_L en tándem, respectivamente.

Se transdujeron linfocitos T de 3 donantes diferentes con los vectores y se sembraron con diferentes diluciones de rapamicina. Después de 24 y 48 horas, se recogieron alícuotas celulares, se tiñeron con APC anti-CD19 y se analizaron mediante citometría de flujo. Inicialmente se clasificaron las células por linfocitos vivos mediante FSC frente a SSC y después se representaron como un histograma de CD19 y se subclasificaron para alta, media y baja expresión en la clasificación de $CD19^+$. Se prepararon gráficos de líneas para representar el porcentaje relativo de la población celular total que expresa altos niveles de CD19, normalizados al "0" de control sin fármaco (Fig. 14). De manera similar al ensayo indicador de SEAP subrogado llevado a cabo en células epiteliales transformadas, a medida que aumentó la concentración de rapamicina, se redujo el porcentaje de células CD19hi en las células que expresaban Caspasa-9 y FRB_L2 o FRB_L3, pero no en células que expresaban Caspasa-9 junto con 0 o 1 dominios FRB_L, lo que indica que la rapamicina induce la heterodimerización entre los armazones a base de FRB e iCaspasa9, lo que da lugar a la dimerización de Caspasa-9 y a la muerte celular. Se observaron resultados similares cuando se reemplazó la rapamicina con C7-isopropoxirapamicina.

Ejemplo 21: Los armazones a base de FRB unidos a moléculas de señalización pueden dimerizar y activar a iCaspasa-9.

Para determinar si los multímeros de FRB podía seguir actuando como armazón de reclutamiento para posibilitar la dimerización de Caspasa-9 mediada por rapálogo cuando se acopla a otro dominio de señalización, se fusionaron 1 o 2 dominios FRB_L a la potente molécula estimuladora quimérica, MyD88/CD40, para obtener $iMC.FRB_L$ (pBP0655) y $iMC.FRB_L2$ (pBP0498), respectivamente (Fig. 9B). Como prueba inicial, se transfectaron transitoriamente células 293 con plásmido indicador SRα-SEAP, Caspasa-9, un CAR anti-HER2 de 1ª generación (pBP0488) y (pBP0655 o pBP0498) (Fig. 15). Los controles de transfección contenían Caspasa-9 (pBP0044) solo o vector de expresión de eGFP (pBP0047). En presencia de rimiducid, las células que contenían Caspasa-9, pero no las eGFP-células de control, fueron eliminadas por la homodimerización de Caspasa-9, como era habitual, reflejado por la disminución de la actividad de SEAP (Fig. 15, izquierda); sin embargo, la rapamicina solo provocó la reducción de SEAP en células que expresaban $iMC.FRB_L2$ y Caspasa-9, pero no en células que expresaban $iMC.FRB_L$ y Caspasa-9 o células de control. Por lo tanto, la activación mediada por heterodimerizador de Caspasa-9 es posible en células que contienen multímeros de FRB_L fusionados a distintas proteínas, tales como MyD88/CD40.

En una segunda prueba para la activación a base de armazón mediada por rapálogo de Caspasa-9, se transfectaron de manera transitoria células 293 con plásmido indicador de SRα-SEAP, más iMC inducible miristoilado o no miristoilado coexpresado con CAR anti-CD19 de 1ª generación, más Caspasa-9 fusionada a FRB_L2 (plásmido pBP0467) (Fig. 16). Tras 24 horas, se trataron células con diluciones log de rimiducid, rapamicina o C7-isopropoxi (IsoP)-rapamicina. A diferencia de Caspasa-9 ligada a FKBP12 (CaspaCIDa), FRB_L2-Caspasa-9 no se activa por rimiducid; sin embargo, se activa por rapamicina o C7-isopropoxi-rapamicina cuando están presentes FKBP en tándem. Por lo tanto, la rapamicina y los análogos pueden activar a Caspasa-9 mediante un armazón molecular formado por dominios FRB o FKBP12.

Ejemplo 22: El "interruptor" iMC, FKBPx2.MyD88.CD40, crea un armazón para FRB_L2. Caspasa9 en presencia de rapamicina para inducir la muerte celular.

El uso de iMC como armazón a base de FKBP12 para activar a FRB_L2-Caspasa-9 se evaluó en linfocitos T primarios (Fig. 17). Se transdujeron linfocitos T primarios (2 donantes) con γ-RV procedentes de SFG-Δmyr.iMC.2A-CD19 (pBP0606) y SFG-FRB_L2.Caspasa9.2A-Q.8stm.zeta (pBP0668). Después, se sembraron los linfocitos T con diluciones de 5 veces de rapamicina. Tras 24 horas, se recogieron las células y se analizaron por citometría de flujo para la expresión de iMC (mediante anti-CD19-APC), Caspasa-9 (mediante anti-CD34-PE) y la identidad del linfocito T (mediante anti-CD3-PerCPCy5.5). Las células se clasificaron inicialmente respecto la morfología de linfocitos mediante FSC frente a SSC, seguido de expresión de CD3 (~ 99 % de los linfocitos).
Para centrarse en las células doblemente transducidas, se clasificaron los linfocitos $CD3^+$ basándose en la expresión de $CD19^+$ (ΔMyr.iMC.2A-CD19) y $CD34^+$ (FRB|2.Caspasa9.2A-Q.8stm.zeta). Para normalizar las poblaciones clasificadas, se dividieron los porcentajes de células $CD34^+CD19^+$ entre el porcentaje de células $CD19^+CD34^-$ en cada muestra como control interno. Se normalizaron estos valores a los pocillos sin fármaco para cada transducción, que se establecieron al 100 %. Los resultados muestran una rápida y eficaz eliminación de las células doblemente transducidas en presencia de niveles relativamente bajos de rapamicina (2 nM) (Fig. 17A, C). Se aplicó un análisis similar a las células con alta, media y baja expresión en la clasificación de $CD34^+CD19^+$ (Fig. 17B). A medida que aumentan las concentraciones de rapamicina, se reduce el porcentaje de células $CD34^+CD19^+$, indicando la eliminación de células. Finalmente, se transdujeron linfocitos T de un solo donante con ΔMyr.iMC.2A-CD19 (pBP0606) y FRB_L2.Caspasa9.2A-Q.8stm.zeta (pBP0668) y se sembraron en medio que contenía IL-2 junto con diversas concentraciones de rapamicina durante 24 o 48 horas. Después de 24 o 48 horas, se recogieron las células y se analizaron por citometría de flujo, como anteriormente. De forma interesante, aunque la eliminación de células que expresaban altos niveles de ambos transgenes fue prácticamente completa a las 24 horas, a las 48 horas incluso las células que expresaban bajos niveles de ambos transgenes fueron eliminadas por la rapamicina, mostrando la eficacia del proceso en linfocitos T primarios (Fig. 17D).

Ejemplo 23: Ejemplos de plásmidos y secuencias analizados en los ejemplos 17-21

pBP0044: iCaspase9wt de pSH1

Fragmento	Nucleótido	Péptido
Enlazador	ATG-CTCGAG	MLE
FKBPv36	GGAGTGCAGGTGGAgACtATCTCCCCAGGAGACGG GCGCACCTTCCCCAAGCGCGGCCAGACCTGCGTG GTGCACTACACCGGGATGCTTGAAGATGGAAAGAA AGTTGATTCCTCCCGGGACAGAAACAAGCCCTTTA AGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCGAGGC TGGGAAGAAGGGGTTGCCCAGATGAGTGTGGGTC AGAGAGCCAAACTGACTATATCTCCAGATTATGCCT ATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCATCATCCCACCA CATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAAA CTGGA	GVQVETISPGDGRTFPK RGQTCVVHYTGMLEDG KKVDSSRDRNKPFKFML GKQEVIRGWEEGVAQM SVGQRAKLTISPDYAYG ATGHPGIIPPHATLVFDV ELLKL
Enlazador	ATCTGGCGGTGGATCCGGA	SGGGSG
Δ Caspase9	GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGAG TTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTTACATCCTGA GCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAAC AATGTGAACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCAC CCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTTGC GGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAG GTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCT GGCTTTGCTGGAGCTGGCGCgGCAGGACCACGGT GCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCA CGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGG GCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGTCGGT CGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCT GCCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTC ATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATG GGTTTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG TCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCC CGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTG GACGCCATATCTAGTTTGCCCACACCCAGTGACAT CTTTGTGTCCTACTCTACTTTCCCAGGTTTTGTTTC CTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTT GAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCA CTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCG CTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAGA TGCCTGGTTGCTTTAATTTCCTCCGGAAAAAACTTT TCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAGCCGAGGGCAGG GGAAGTCTTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAA TCCCGGGCCC-tga	VDGFGDVGALESLRGN ADLAYILSMEPCGHCLII NNVNFCRESGLRTRTGS NIDCEKLRRRFSSLHFM VEVKGDLTAKKMVLALL ELARQDHGALDCCVVVI LSHGCQASHLQFPGAVY GTDGCPVSVEKIVNIFNG TSCPSLGGKPKLFFIQAC GGEQKDHGFEVASTSP EDESPGSNPEPDATPFQ EGLRTFDQLDAISSLPTP SDIFVSYSTFPGFVSWR DPKSGSWYVETLDDIFE QWAHSEDLQSLLLRVAN AVSVKGIYKQMPGCFNF LRKKLFFKTS

(continuación)

Enlazador	GCTAGCAGAGCC	ASRA
T2A	GAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGGGACG TGGAGGAAAATCCCGGGCCC-tga	EGRGSLLTCGDVEENP GP*

pBP0463--pSH1-Fpk-Fpk'.LS.Fpk".Fpk"'.LS.HA

Fragmento	Nucleótido	Péptido
Enlazador	ATGCTCGAG	MLE
FRBI	TGGCATGAAGGGTTGGAAGAAGCTTCAAGGCTGT	GVQVETISPGDGRTFPK
	ACTTCGGAGAGAGGAACGTGAAGGGCATGTTTGA	RGQTCVVHYTGMLEDG
	GGTTCTTGAACCTCTGCACGCCATGATGGAACGG	KKFDSSRDRNKPFKFML
	GGACCGCAGACACTGAAAGAAACCTCTTTTAATC	GKQEVIRGWEEGVAQM
	AGGCCTACGGCAGAGACCTGATGGAGGCCCAAG	SVGQRAKLTISPDYAYG
	AATGGTGTAGAAAGTATATGAAATCCGGTAACGT	ATGHPPKIPPHATLVFDV
	GAAAGACCTGCTCCAGGCCTGGGACCTTTATTAC	ELLKLE
	CATGTGTTCAGGCGGATCAGTAAG	
Enlazador	TCAGGCGGTGGCTCAGGTGTCGAG	SGGGSGVD
Δ-Caspasa9	GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGA	DGFGDVGALESLRGNA
	GTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTTACATCCT	DLAYILSMEPCGHCLIIN
	GAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATC	NVNFCRESGLRTRTGSN
	AACAATGTGAACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCC	IDCEKLRRRFSSLHFMV
	GCACCCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAA	EVKGDLTAKKMVLALLE
	GTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTCATG	LARQDHGALDCCVVVIL
	GTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAA	SHGCQASHLQFPGAVY
	ATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCgGCAG	GTDGCPVSVEKIVNIFNG
	GACCACGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTC	TSCPSLGGKPKLFFIQAC
	ATTCTCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGC	GGEQKDHGFEVASTSP
	AGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGAT	EDESPGSNPEPDATPFQ
	GCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTT	EGLRTFDQLDAISSLPTP
	CAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGAA	SDIFVSYSTFPGFVSWR
	GCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGG	DPKSGSWYVETLDDIFE
	GAGCAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCTCC	QWAHSEDLQSLLLRVAN
	ACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACC	AVSVKGIYKQMPGCFNF
	CCGAGCCAGATGCCACCCCGTTCCAGGAAGGTT	LRKKLFFKTSASRA
	TGAGGACCTTCGACCAGCTGGACGCCATATCTAG	

(continuación)

Fragmento	Nucleótido	Péptido
	TTTGCCCACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACT	
	CTACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCC	
	CAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA	
	CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAGAC	
	CTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTG	
	TTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGG	
	TTGCTTTAATTTCCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAA	
	AACATCAGCTAGCAGAGCC	
T2A	GAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGGGAC	EGRGSLLTCGDVEENP
	GTGGAGGAAAATCCCGGGCCCtga	GP

pBP0725--pSH1-FRBI.FRBI'.LS.FRBI".FRBI'"

Fragmento	Nucleótido	Péptido
FRBI	ATGctcgagTGGCATGAAGGCCTGGAAGAGGCATC	MLEWHEGLEEASRLYF
	TCGTTTGTACTTTGGGGAAAGGAACGTGAAAGGC	GERNVKGMFEVLEPLHA
	ATGTTTGAGGTGCTGGAGCCCTTGCACGCTATGA	MMERGPQTLKETSFNQ
	TGGAACGGGGCCCCCAGACTCTGAAGGAAACAT	AYGRDLMEAQEWCRKY
	CCTTTAATCAGGCCTATGGTCGAGATTTAATGGA	MKSGNVKDLLQAWDLY
	GGCCCAAGAGTGGTGCAGGAAGTACATGAAATCA	YHVFRRISK
	GGGAATGTCAAGGACCTCCTCCAAGCCTGGGAC	
	CTCTATTATCATGTGTTCCGACGAATCTCAAAG	
Enlazador	gtcgag	VD
FRBI'	TGGCATGAAGGGTTGGAAGAAGCTTCAAGGCTGT	WHEGLEEASRLYFGER
	ACTTCGGAGAGAGGAACGTGAAGGGCATGTTTGA	NVKGMFEVLEPLHAMM
	GGTTCTTGAACCTCTGCACGCCATGATGGAACGG	ERGPQTLKETSFNQAYG
	GGACCGCAGACACTGAAAGAAACCTCTTTTAATC	RDLMEAQEWCRKYMKS
	AGGCCTACGGCAGAGACCTGATGGAGGCCCAAG	GNVKDLLQAWDLYYHVF
	AATGGTGTAGAAAGTATATGAAATCCGGTAACGT	RRISK
	GAAAGACCTGCTCCAGGCCTGGGACCTTTATTAC	
	CATGTGTTCAGGCGGATCAGTAAG	
Enlazador		SGGGSGVD
FRBI"	TGGCATGAAGGCCTGGAAGAGGCATCTCGTTTGT	WHEGLEEASRLYFGER
	ACTTTGGGGAAAGGAACGTGAAAGGCATGTTTGA	NVKGMFEVLEPLHAMM

(continuación)

Fragmento	Nucleótido	Péptido
	GGTGCTGGAGCCCTTGCACGCTATGATGGAACG GGGCCCCCAGACTCTGAAGGAAACATCCTTTAAT CAGgCCTATGGTCGAGATTTAATGGAGGCCCAAG AGTGGtGCAGGAAGTACATGAAATCAGGGAATGT CAAGGACCTCCTCCAAGCCTGGGACCTCTATTAT CATGTGTTCCGACGAATCTCAAAG	ERGPQTLKETSFNQAYG RDLMEAQEWCRKYMKS GNVKDLLQAWDLYYHVF RRISK
Enlazador	GTCGAC	VD
FRBI'''	TGGCATGAAGGGTTGGAAGAAGCTTCAAGGCTGT ACTTCGGAGAGAGGAACGTGAAGGGCATGTTTGA GGTTCTTGAACCTCTGCACGCCATGATGGAACGG GGACCGCAGACACTGAAAGAAACCTCTTTTAATC AGGCCTACGGCAGAGACCTGATGGAGGCCCAAG AATGGTGTaGAAAGTATATGAAATCCGGTAACGT GAAAGACCTGCTCCAGGCCTGGGACCTTTATTAC CATGTGTTCAGGCGGATCAGTAAGTCAGGCGGT GGCTCAGGTGTCGAC	WHEGLEEASRLYFGER NVKGMFEVLEPLHAMM ERGPQTLKETSFNQAYG RDLMEAQEWCRKYMKS GNVKDLLQAWDLYYHVF RRISK
Enlazador	GTCGAC	VE
Marcador de HA	TATCCGTACGACGTACCAGACTACGCACTCGACT AA	YPYDVPDYALD*

pBP0465--pSH1-M-FRBI.FRBr.LS.HA

Fragmento	Nucleótido	Péptido
Myr	atgggctgtgtgcaatgtaaggataaagaagcaacaaaactgacgga ggag	MGCVQCKDKEATKLTEE
Enlazador	CTCGAG	LG
FRBI	TGGCATGAAGGCCTGGAAGAGGCATCTCGTTTGT ACTTTGGGGAAAGGAACGTGAAAGGCATGTTTGA GGTGCTGGAGCCCTTGCACGCTATGATGGAACG GGGCCCCCAGACTCTGAAGGAAACATCCTTTAAT CAGGCCTATGGTCGAGATTTAATGGAGGCCCAAG AGTGGTGCAGGAAGTACATGAAATCAGGGAATGT CAAGGACCTCCCTCCAAGCCTGGGACCCTCTATTAT CATGTGTTCCGACGAATCTCAAAG	MLEWHEGLEEASRLYF GERNVKGMFEVLEPLHA MMERGPQTLKETSFNQ AYGRDLMEAQEWCRKY MKSGNVKDLLQAWDLY YHVFRRISK
Enlazador	gtcgag	VD
FRBI'	TGGCATGAAGGGTTGGAAGAAGCTTCAAGGCTGT ACTTCGGAGAGAGGAACGTGAAGGGCATGTTTGA GGTTCTTGAACCTCTGCACGCCATGATGGAACGG GGACCGCAGACACTGAAAGAAACCTCTTTTAATC AGGCCTACGGCAGAGACCTGATGGAGGCCCAAG AATGGTGTAGAAAGTATATGAAATCCGGTAACGT GAAAGACCTGCTCCAGGCCTGGGACCTTTATTAC CATGTGTTCAGGCGGATCAGTAAG	WHEGLEEASRLYFGER NVKGMFEVLEPLHAMM ERGPQTLKETSFNQAYG RDLMEAQEWCRKYMKS GNVKDLLQAWDLYYHVF RRISK
Enlazador	TCAGGCGGTGGCTCAGGTG	SGGGSGVD
Marcador de HA	tatccgtacgacgtaccagactacgcactcgactaa	YPYDVPDYALD*

pBP0722--pSH1-Fpk-Fpk'.LS.Fpk".Fpk"'LS.HA

Fragmento	Nucleótido	Péptido
Enlazador	ATGCTCGAG	MLE
FKBPpk	GGcGTcCAaGTcGAaACcATtagtCCcGGcGAtGGcaG	GVQVETISPGDGRTFPK
	aACaTTtCCtAAaaGgGGaCAaACaTGtGTcGTcCAtTA	RGQTCVVHYTGMLEDG
	tACaGGcATGtTgGAgGAcGGcAAaAAgttcGAcagtagta	KKFDSSRDRNKPFKFML
	GaGAtcGcAAtAAaCCtTTcAAaTTcATGtTgGGaAAaC	GKQEVIRGWEEGVAQM
	AaGAaGTcATtaGgGGaTGGGAgGAgGGcGTgGCtC	SVGQRAKLTISPDYAYG
	AaATGtccGTcGGcCAacGcGCtAAgCTcACcATcagcC	ATGHPPKIPPHATLVFDV
	CcGAcTAcGCaTAcGGcGCtACcGGaCAtCCccctaagA	ELLKLE
	TtCCcCCtCAcGCtACctTgGTgTTtGAcGTcGAaCTgtT	
	gAAgCTcGAa	
Enlazador	gtcgag	VD
FKBPpk'	ggagtgcaggtggagactatctccccaggagacgggcgcaccttcccc	GVQVETISPGDGRTFPK
	aagcgcggccagacctgcgtggtgcactacacccgggatgcttgaagat	RGQTCVVHYTGMLEDG
	ggaaagaaattcgattcctctcgggacagaaacaagccctttaagtttat	KKFDSSRDRNKPFKFML
	gctaggcaagcaggaggtgatccgaggctgggaagaaggggttgccc	GKQEVIRGWEEGVAQM
	agatgagtgtgggtcagagagccaaactgactatatctccagattatgcc	SVGQRAKLTISPDYAYG
	tatggtgccactgggcacccacctaagatcccaccaccatgccactctcgt	ATGHPPKIPPHATLVFDV
	cttcgatgtggagcttctaaaactggaa	ELLKLE
Enlazador		SGGGSGVD
FKBPpk"	GGcGTcCAaGTcGAaACcATtagtCCcGGcGAtGGcaG	GVQVETISPGDGRTFPK
	aACaTTtCCtAAaaGgGGaCAaACaTGtGTcGTcCAtTA	RGQTCVVHYTGMLEDG

(continuación)

Fragmento	Nucleótido	Péptido
	tACaGGcATGtTgGAgGAcGGcAAaAAgttcGAcagtagta	KKFDSSRDRNKPFKFML
	GaGAtcGcAAtAAaCCtTTcAAaTTcATGtTgGGaAAaC	GKQEVIRGWEEGVAQM
	AaGAaGTcATtaGgGGaTGGGAgGAgGGcGTgGCtC	SVGQRAKLTISPDYAYG
	AaATGtccGTcGGcCAacGcGCtAAgCTcACcATcagcC	ATGHPPKIPPHATLVFDV
	CcGAcTAcGCaTAcGGcGCtACcGGaCAtCCccctaagA	ELLKLE
	TtCCcCCtCAcGCtACctTgGTgTTtGAcGTcGAaCTgtT	
	gAAgCTcGAa	
Enlazador	GTCGAC	VD
FKBPpk'''	ggagtgcaggtggagactatctcccaggagacgggcgcaccttcccc	GVQVETISPGDGRTFPK
	aagcgcggccagacctgcgtggtgcactacccgggatgcttgaagat	RGQTCVVHYTGMLEDG
	ggaaagaaattcgattcctctcgggacagaaacaagccctttaagtttat	KKFDSSRDRNKPFKFML
	gctaggcaagcaggaggtgatccgaggctgggaagaagggttgccc	GKQEVIRGWEEGVAQM
	agatgagtgtgggtcagagaggccaaactgactatatctccagattatgcc	SVGQRAKLTISPDYAYG
	tatggtgccactgggcacccacctaagatcccaccacatgccactctcgt	ATGHPPKIPPHATLVFDV
	cttcgatgtggagcttctaaaactggaa	ELLKLE
Enlazador		SGGGSGVD
Marcador de HA	TATCCGTACGACGTACCAGACTACGCACTCGACT	YPYDVPDYALD*
	AA	

pBP0220--pSFG-iC9.T2A-ΔCD19

Fragmento	Nucleótido	Péptido
FKBP12v36	ATGCTCGAGGGAGTGCAGGTGGAGACTATCTCCCC	MLEGVQVETISPGDGRT
	AGGAGACGGGCGCACCTTCCCCAAGCGCGGCCAG	FPKRGQTCVVHYTGML
	ACCTGCGTGGTGCACTACACCGGGATGCTTGAAGA	EDGKKVDSSRDRNKPF
	TGGAAAGAAAGTTGATTCCTCCCGGGACAGAAACA	KFMLGKQEVIRGWEEG
	AGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTG	VAQMSVGQRAKLTISPD
	ATCCGAGGCTGGGAAGAAGGGGTTGCCCAGATGA	YAYGATGHPGIIPPHATL
	GTGTGGGTCAGAGAGCCAAACTGACTATATCTCCA	VFDVELLKLE
	GATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCAT	
	CATCCCACCACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGG	
	AGCTTCTAAAACTGGAA	
Enlazador	TCTGGCGGTGGATCCGGA	SGGGSG
ΔCaspasa9	GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGAG	VDGFGDVGALESLRGN
	TTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTTACATCCTGA	ADLAYILSMEPCGHCLII
	GCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAAC	NNVNFCRESGLRTRTGS
	AATGTGAACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCAC	NIDCEKLRRRFSSLHFM
	CCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTTGC	VEVKGDLTAKKMVLALL
	GGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAG	ELARQDHGALDCCVVVI
	GTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCT	LSHGCQASHLQFPGAVY
	GGCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGT	GTDGCPVSVEKIVNIFNG
	GCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCA	TSCPSLGGKPKLFFIQAC
	CGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGG	GGEQKDHGFEVASTSP
	GCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGTCGGT	EDESPGSNPEPDATPFQ
	CGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCT	EGLRTFDQLDAISSLPTP
	GCCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTC	SDIFVSYSTFPGFVSWR
	ATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATG	DPKSGSWYVETLDDIFE
	GGTTTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG	QWAHSEDLQSLLLRVAN
	TCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCC	AVSVKGIYKQMPGCFNF
	CGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTG	LRKKLFFKTSASRA
	GACGCCATATCTAGTTTGCCCACACCCAGTGACAT	
	CTTTGTGTCCTACTCTACTTTCCCAGGTTTTGTTTC	
	CTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTT	
	GAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCA	
	CTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCG	
	CTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAGA	
	TGCCTGGTTGCTTTAATTTCCTCCGGAAAAAACTTT	
	TCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAGCC	

(continuación)

Fragmento	Nucleótido	Péptido
T2A	GAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGGGACG TGGAGGAAAATCCCGGGCCC	EGRGSLLTCGDVEENP GP
ΔCD19	ATGCCACCTCCTCGCCTCCTCTTCTTCCTCCTCTTC CTCACCCCCATGGAAGTCAGGCCCGAGGAACCTCT AGTGGTGAAGGTGGAAGAGGGAGATAACGCTGTG CTGCAGTGCCTCAAGGGGACCTCAGATGGCCCCA CTCAGCAGCTGACCTGGTCTCGGGAGTCCCCGCTT AAACCCTTCTTAAAACTCAGCCTGGGGCTGCCAGG CCTGGGAATCCACATGAGGCCCCTGGCCATCTGG CTTTTCATCTTCAACGTCTCTCAACAGATGGGGGG CTTCTACCTGTGCCAGCCGGGGCCCCCCTCTGAGA AGGCCTGGCAGCCTGGCTGGACAGTCAATGTGGA GGGCAGCGGGGAGCTGTTCCGGTGGAATGTTTCG GACCTAGGTGGCCTGGGCTGTGGCCTGAAGAACA GGTCCTCAGAGGGCCCCAGCTCCCCTTCCGGGAA GCTCATGAGCCCCAAGCTGTATGTGTGGGCCAAAG ACCGCCCTGAGATCTGGGAGGGAGAGCCTCCGTG TCTCCCACCGAGGGACAGCCTGAACCAGAGCCTCA GCCAGGACCTCACCATGGCCCCTGGCTCCACACTC TGGCTGTCCTGTGGGGTACCCCCTGACTCTGTGTC CAGGGGCCCCCTCTCCTGGACCCATGTGCACCCC AAGGGGCCTAAGTCATTGCTGAGCCTAGAGCTGAA GGACGATCGCCCGGCCAGAGATATGTGGGTAATG GAGACGGGTCTGTTGTTGCCCCGGGCCACAGCTC AAGACGCTGGAAAGTATTATTGTCACCGTGGCAAC CTGACCATGTCATTCCACCTGGAGATCACTGCTCG GCCAGTACTATGGCACTGGCTGCTGAGGACTGGTG GCTGGAAGGTCTCAGCTGTGACTTTGGCTTATCTG ATCTTCTGCCTGTGTTCCCTTGTGGGCATTCTTCAT CTTCAAAGAGCCCTGGTCCTGAGGAGGAAAAGAAA GCGAATGACTGACCCCACCAGGAGATTCTAA	MPPPRLLFFLLFLTPMEV RPEEPLVVKVEEGDNAV LQCLKGTSDGPTQQLT WSRESPLKPFLKLSLGL PGLGIHMRPLAIWLFIFN VSQQMGGFYLCQPGPP SEKAWQPGWTVNVEGS GELFRWNVSDLGGLGC GLKNRSSEGPSSPSGKL MSPKLYVWAKDRPEIWE GEPPCLPPRDSLNQSLS QDLTMAPGSTLWLSCG VPPDSVSRGPLSWTHV HPKGPKSLLSLELKDDR PARDMWVMETGLLLPR ATAQDAGKYYCHRGNL TMSFHLEITARPVLWHW LLRTGGWKVSAVTLAYLI FCLCSLVGILHLQRALVL RRKRKRMTDPTRRF*

pBP0756--pSFG-iC9.T2A-dCD19.P2A-FRBI

Fragmento	Nucleótido	Péptido
FKBP12v36	ATGCTCGAGGGAGTGCAGGTGGAGACTATCTCCCC AGGAGACGGGCGCACCTTCCCCAAGCGCGGCCAG ACCTGCGTGGTGCACTACACCGGGATGCTTGAAGA TGGAAAGAAAGTTGATTCCTCCCGGGACAGAAACA AGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTG ATCCGAGGCTGGGAAGAAGGGGTTGCCCAGATGA GTGTGGGTCAGAGAGCCAAACTGACTATATCTCCA GATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCAT CATCCCACCACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGG AGCTTCTAAAACTGGAA	MLEGVQVETISPGDGRT FPKRGQTCVVHYTGML EDGKKVDSSRDRNKPF KFMLGKQEVIRGWEEG VAQMSVGQRAKLTISPD YAYGATGHPGIIPPHATL VFDVELLKLE
Enlazador	TCTGGCGGTGGATCCGGA	SGGGSG
dCaspase9	GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGAG TTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTTACATCCTGA GCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAAC AATGTGAACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCAC CCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTTGC GGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAG GTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCT GGCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGT GCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCA CGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGG GCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGTCGGT CGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCT GCCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTC ATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATG GGTTTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG TCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCC CGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTG GACGCCATATCTAGTTTGCCCACACCCAGTGACAT CTTTGTGTCCTACTCTACTTTCCCAGGTTTTGTTTC CTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTT GAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCA	VDGFGDVGALESLRGN ADLAYILSMEPCGHCLII NNVNFCRESGLRTRTGS NIDCEKLRRRFSSLHFM VEVKGDLTAKKMVLALL ELARQDHGALDCCVVVI LSHGCQASHLQFPGAVY GTDGCPVSVEKIVNIFNG TSCPSLGGKPKLFFIQAC GGEQKDHGFEVASTSP EDESPGSNPEPDATPFQ EGLRTFDQLDAISSLPTP SDIFVSYSTFPGFVSWR DPKSGSWYVETLDDIFE QWAHSEDLQSLLLRVAN AVSVKGIYKQMPGCFNF LRKKLFFKTSASRA

(continuación)

Fragmento	Nucleótido	Péptido
	CTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCG CTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAGA TGCCTGGTTGCTTTAATTTCCTCCGGAAAAAACTTT TCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAGCC	
T2A	GAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGGGACG TGGAGGAAAATCCCGGGCCC	EGRGSLLTCGDVEENP GP
dCD19	ATGCCACCTCCTCGCCTCCTCTTCTTCCTCCTCTTC CTCACCCCCATGGAAGTCAGGCCCGAGGAACCTCT AGTGGTGAAGGTGGAAGAGGGAGATAACGCTGTG CTGCAGTGCCTCAAGGGGACCTCAGATGGCCCCA CTCAGCAGCTGACCTGGTCTCGGGAGTCCCCGCTT AAACCCTTCTTAAAACTCAGCCTGGGGCTGCCAGG CCTGGGAATCCACATGAGGCCCCTGGCCATCTGG CTTTTCATCTTCAACGTCTCTCAACAGATGGGGGG CTTCTACCTGTGCCAGCCGGGGCCCCCCTCTGAGA AGGCCTGGCAGCCTGGCTGGACAGTCAATGTGGA GGGCAGCGGGGAGCTGTTCCGGTGGAATGTTTCG GACCTAGGTGGCCTGGGCTGTGGCCTGAAGAACA GGTCCTCAGAGGGCCCCAGCTCCCCTTCCGGGAA GCTCATGAGCCCCAAGCTGTATGTGTGGGCCAAAG ACCGCCCTGAGATCTGGGAGGGAGAGCCTCCGTG TCTCCCACCGAGGGACAGCCTGAACCAGAGCCTCA GCCAGGACCTCACCATGGCCCCTGGCTCCACACTC TGGCTGTCCTGTGGGGTACCCCCTGACTCTGTGTC CAGGGGCCCCCTCTCCTGGACCCATGTGCACCCC AAGGGGCCTAAGTCATTGCTGAGCCTAGAGCTGAA GGACGATCGCCCGGCCAGAGATATGTGGGTAATG GAGACGGGTCTGTTGTTGCCCCGGGCCACAGCTC AAGACGCTGGAAAGTATTATTGTCACCGTGGCAAC CTGACCATGTCATTCCACCTGGAGATCACTGCTCG GCCAGTACTATGGCACTGGCTGCTGAGGACTGGTG GCTGGAAGGTCTCAGCTGTGACTTTGGCTTATCTG ATCTTCTGCCTGTGTTCCCTTGTGGGCATTCTTCAT CTTCAAAGAGCCCTGGTCCTGAGGAGGAAAAGAAA GCGAATGACTGACCCCACCAGGAGATTC	MPPPRLLFFLLFLTPMEV RPEEPLVVKVEEGDNAV LQCLKGTSDGPTQQLT WSRESPLKPFLKLSLGL PGLGIHMRPLAIWLFIFN VSQQMGGFYLCQPGPP SEKAWQPGWTVNVEGS GELFRWNVSDLGGLGC GLKNRSSEGPSSPSGKL MSPKLYVWAKDRPEIWE GEPPCLPPRDSLNQSLS QDLTMAPGSTLWLSCG VPPDSVSRGPLSWTHV HPKGPKSLLSLELKDDR PARDMWVMETGLLLPR ATAQDAGKYYCHRGNL TMSFHLEITARPVLWHW LLRTGGWKVSAVTLAYLI FCLCSLVGILHLQRALVL RRKRKRMTDPTRRF
gsg	GGGAGTGGG	GSG

(continuación)

Fragmento	Nucleótido	Péptido
P2A	GCTACGAATTTTAGCTTGCTGAAGCAGGCCGGTGA TGTGGAAGAGAACCCCGGGCCT	ATNFSLLKQAGDVEENP GP
FRBI	TGGCACGAAGGTTTGGAAGAGGCCTCCCGCCTGTA TTTCGGTGAGAGAAATGTCAAAGGTATGTTTGAAGT GCTTGAGCCCCTGCACGCCATGATGGAACGGGGG CCGCAGACTCTGAAAGAAACCTCATTCAACCAGGC ATACGGGCGAGACCTGATGGAAGCGCAGGAATGG TGTAGGAAGTACATGAAGTCCGGAAATGTGAAGGA CTTGCTCCAGGCTTGGGACCTGTACTATCACGTATT TCGGAGAATAAGCAAG-TAA	WHEGLEEASRLYFGER NVKGMFEVLEPLHAMM ERGPQTLKETSFNQAYG RDLMEAQEWCRKYMKS GNVKDLLQAWDLYYHVF RRISK*

pBP0755--pSFG-iC9.T2A-dCD19.P2A-FRBi2

Fragmento	Nucleótido	Péptido
FKBP12v36	ATGCTCGAGGGAGTGCAGGTGGAGACTATCTCCCC AGGAGACGGGCGCACCTTCCCCAAGCGCGGCCAG ACCTGCGTGGTGCACTACACCGGGATGCTTGAAGA TGGAAAGAAAGTTGATTCCTCCCGGGACAGAAACA AGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTG ATCCGAGGCTGGGAAGAAGGGGTTGCCCAGATGA GTGTGGGTCAGAGAGCCAAACTGACTATATCTCCA GATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCAT CATCCCACCACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGG AGCTTCTAAAACTGGAA	MLEGVQVETISPGDGRT FPKRGQTCVVHYTGML EDGKKVDSSRDRNKPF KFMLGKQEVIRGWEEG VAQMSVGQRAKLTISPD YAYGATGHPGIIPPHATL VFDVELLKLE
Enlazador	TCTGGCGGTGGATCCGGA	SGGGSG

(continuación)

Fragmento	Nucleótido	Péptido
ΔCaspasa 9	GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGAG TTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTTACATCCTGA GCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAAC AATGTGAACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCAC CCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTTGC GGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAG GTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCT GGCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGT GCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCA CGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGG GCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGTCGGT CGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCT GCCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTC ATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATG GGTTTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG TCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCC CGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTG GACGCCATATCTAGTTTGCCCACACCCAGTGACAT CTTTGTGTCCTACTCTACTTTCCCAGGTTTTGTTTC CTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTT GAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCA CTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCG CTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAGA TGCCTGGTTGCTTTAATTTCCTCCGGAAAAAACTTT TCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAGCC	VDGFGDVGALESLRGN ADLAYILSMEPCGHCLII NNVNFCRESGLRTRTGS NIDCEKLRRRFSSLHFM VEVKGDLTAKKMVLALL ELARQDHGALDCCVVVI LSHGCQASHLQFPGAVY GTDGCPVSVEKIVNIFNG TSCPSLGGKPKLFFIQAC GGEQKDHGFEVASTSP EDESPGSNPEPDATPFQ EGLRTFDQLDAISSLPTP SDIFVSYSTFPGFVSWR DPKSGSWYVETLDDIFE QWAHSEDLQSLLLRVAN AVSVKGIYKQMPGCFNF LRKKLFFKTSASRA
T2A	GAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGGGACG TGGAGGAAAATCCCGGGCCC	EGRGSLLTCGDVEENP GP

(continuación)

Fragmento	Nucleótido	Péptido
ΔCD19	ATGCCACCTCCTCGCCTCCTCTTCTTCCTCCTCTTC CTCACCCCCATGGAAGTCAGGCCCGAGGAACCTCT AGTGGTGAAGGTGGAAGAGGGAGATAACGCTGTG CTGCAGTGCCTCAAGGGGACCTCAGATGGCCCCA CTCAGCAGCTGACCTGGTCTCGGGAGTCCCCGCTT AAACCCTTCTTAAAACTCAGCCTGGGGCTGCCAGG CCTGGGAATCCACATGAGGCCCCTGGCCATCTGG CTTTTCATCTTCAACGTCTCTCAACAGATGGGGGG CTTCTACCTGTGCCAGCCGGGGCCCCCCTCTGAGA AGGCCTGGCAGCCTGGCTGGACAGTCAATGTGGA GGGCAGCGGGGAGCTGTTCCGGTGGAATGTTTCG GACCTAGGTGGCCTGGGCTGTGGCCTGAAGAACA GGTCCTCAGAGGGCCCCAGCTCCCCTTCCGGGAA GCTCATGAGCCCCAAGCTGTATGTGTGGGCCAAAG ACCGCCCTGAGATCTGGGAGGGAGAGCCTCCGTG TCTCCCACCGAGGGACAGCCTGAACCAGAGCCTCA GCCAGGACCTCACCATGGCCCCTGGCTCCACACTC TGGCTGTCCTGTGGGGTACCCCCTGACTCTGTGTC CAGGGGCCCCCTCTCCTGGACCCATGTGCACCCC AAGGGGCCTAAGTCATTGCTGAGCCTAGAGCTGAA GGACGATCGCCCGGCCAGAGATATGTGGGTAATG GAGACGGGTCTGTTGTTGCCCCGGGCCACAGCTC AAGACGCTGGAAAGTATTATTGTCACCGTGGCAAC CTGACCATGTCATTCCACCTGGAGATCACTGCTCG GCCAGTACTATGGCACTGGCTGCTGAGGACTGGTG GCTGGAAGGTCTCAGCTGTGACTTTGGCTTATCTG ATCTTCTGCCTGTGTTCCCTTGTGGGCATTCTTCAT CTTCAAAGAGCCCTGGTCCTGAGGAGGAAAAGAAA GCGAATGACTGACCCCACCAGGAGATTC	MPPPRLLFFLLFLTPMEV RPEEPLVVKVEEGDNAV LQCLKGTSDGPTQQLT WSRESPLKPFLKLSLGL PGLGIHMRPLAIWLFIFN VSQQMGGFYLCQPGPP SEKAWQPGWTVNVEGS GELFRWNVSDLGGLGC GLKNRSSEGPSSPSGKL MSPKLYVWAKDRPEIWE GEPPCLPPRDSLNQSLS QDLTMAPGSTLWLSCG VPPDSVSRGPLSWTHV HPKGPKSLLSLELKDDR PARDMWVMETGLLLPR ATAQDAGKYYCHRGNL TMSFHLEITARPVLWHW LLRTGGWKVSAVTLAYLI FCLCSLVGILHLQRALVL RRKRKRMTDPTRRF
enlazador GSG	GGGAGTGGG	GSG
P2A	GCTACGAATTTTAGCTTGCTGAAGCAGGCCGGTGA TGTGGAAGAGAACCCCGGGCCT	ATNFSLLKQAGDVEENP GP
FRBI	TGGCATGAAGGTCTGGAAGAAGCTTCTCGCCTTTA TTTTGGCGAACGGAACGTAAAAGGTATGTTTGAAGT CCTGGAGCCATTGCACGCCATGATGGAGCGCGGG CCTCAGACCCTCAAGGAAACCAGTTTTAATCAGGC CTATGGGCGAGACCTCATGGAGGCACAGGAATGG TGTCGGAAGTATATGAAGTCCGGCAACGTTAAGGA TCTCTTGCAGGCCTGGGACTTGTATTATCACGTGTT CCGGCGAATCAGCAAG	WHEGLEEASRLYFGER NVKGMFEVLEPLHAMM ERGPQTLKETSFNQAYG RDLMEAQEWCRKYMKS GNVKDLLQAWDLYYHVF RRISK

(continuación)

Fragmento	Nucleótido	Péptido
Enlazador	Cgtacg	RT
FRBI"	TGGCACGAAGGTTTGGAAGAGGCCTCCCGCCTGTA	WHEGLEEASRLYFGER
	TTTCGGTGAGAGAAATGTCAAAGGTATGTTTGAAGT	NVKGMFEVLEPLHAMM
	GCTTGAGCCCCTGCACGCCATGATGGAACGGGGG	ERGPQTLKETSFNQAYG
	CCGCAGACTCTGAAAGAAACCTCATTCAACCAGGC	RDLMEAQEWCRKYMKS
	ATACGGGCGAGACCTGATGGAAGCGCAGGAATGG	GNVKDLLQAWDLYYHVF
	TGTAGGAAGTACATGAAGTCCGGAAATGTGAAGGA	RRISK*
	CTTGCTCCAGGCTTGGGACCTGTACTATCACGTATT	
	TCGGAGAATAAGCAAG-TAA	

pBP0757--pSFG-iC9T2A-dCD19.P2A-FRBi3

Fragmento	Nucleótido	Péptido
FKBP12v36	ATGCTCGAGGGAGTGCAGGTGGAGACTATCTCC	MLEGVQVETISPGDGRT
	CCAGGAGACGGGCGCACCTTCCCCAAGCGCGGC	FPKRGQTCVVHYTGML
	CAGACCTGCGTGGTGCACTACACCGGGATGCTT	EDGKKVDSSRDRNKPF
	GAAGATGGAAAGAAAGTTGATTCCTCCCGGGACA	KFMLGKQEVIRGWEEG
	GAAACAAGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGCAAGCA	VAQMSVGQRAKLTISPD
	GGAGGTGATCCGAGGCTGGGAAGAAGGGGTTGC	YAYGATGHPGIIPPHATL
	CCAGATGAGTGTGGGTCAGAGAGCCAAACTGACT	VFDVELLKLE
	ATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGC	
	ACCCAGGCATCATCCCACCACATGCCACTCTCGT	
	CTTCGATGTGGAGCTTCTAAAACTGGAA	
Enlazador	TCTGGCGGTGGATCCGGA	SGGGSG

(continuación)

Fragmento	Nucleótido	Péptido
ΔCaspasa 9	GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGA GTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTTACATCCT GAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATC AACAATGTGAACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCC GCACCCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAA GTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTCATG GTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAA ATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAG GACCACGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTC ATTCTCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGC AGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGAT GCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTT CAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGAA GCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGG GAGCAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCTCC ACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACC CCGAGCCAGATGCCACCCCGTTCCAGGAAGGTT TGAGGACCTTCGACCAGCTGGACGCCATATCTAG TTTGCCCACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACT CTACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCC CAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAGAC CTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTG TTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGG TTGCTTTAATTTCCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAA AACATCAGCTAGCAGAGCC	VDGFGDVGALESLRGN ADLAYILSMEPCGHCLI NNVNFCRESGLRTRTGS NIDCEKLRRRFSSLHFM VEVKGDLTAKKMVLALL ELARQDHGALDCCVVVI LSHGCQASHLQFPGAVY GTDGCPVSVEKIVNIFNG TSCPSLGGKPKLFFIQAC GGEQKDHGFEVASTSP EDESPGSNPEPDATPFQ EGLRTFDQLDAISSLPTP SDIFVSYSTFPGFVSWR DPKSGSWYVETLDDIFE QWAHSEDLQSLLLRVAN AVSVKGIYKQMPGCFNF LRKKLFFKTSASRA
T2A	GAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGGGAC GTGGAGGAAAATCCCGGGCCC	EGRGSLLTCGDVEENP GP

(continuación)

Fragmento	Nucleótido	Péptido
Δ CD19	ATGCCACCTCCTCGCCTCCTCTTCTTCCTCCTCTT CCTCACCCCCATGGAAGTCAGGCCCGAGGAACC TCTAGTGGTGAAGGTGGAAGAGGGAGATAACGC TGTGCTGCAGTGCCTCAAGGGGACCTCAGATGG CCCCACTCAGCAGCTGACCTGGTCTCGGGAGTC CCCGCTTAAACCCTTCTTAAAACTCAGCCTGGGG CTGCCAGGCCTGGGAATCCACATGAGGCCCCTG GCCATCTGGCTTTTCATCTTCAACGTCTCTCAACA GATGGGGGGCTTCTACCTGTGCCAGCCGGGGCC CCCCTCTGAGAAGGCCTGGCAGCCTGGCTGGAC AGTCAATGTGGAGGGCAGCGGGGAGCTGTTCCG GTGGAATGTTTCGGACCTAGGTGGCCTGGGCTG TGGCCTGAAGAACAGGTCCTCAGAGGGCCCCAG CTCCCCTTCCGGGAAGCTCATGAGCCCCAAGCT GTATGTGTGGGCCAAAGACCGCCCTGAGATCTG GGAGGGAGAGCCTCCGTGTCTCCCACCGAGGGA CAGCCTGAACCAGAGCCTCAGCCAGGACCTCAC CATGGCCCCTGGCTCCACACTCTGGCTGTCCTGT GGGGTACCCCCTGACTCTGTGTCCAGGGGCCCC CTCTCCTGGACCCATGTGCACCCCAAGGGGCCT AAGTCATTGCTGAGCCTAGAGCTGAAGGACGATC GCCCGGCCAGAGATATGTGGGTAATGGAGACGG GTCTGTTGTTGCCCCGGGCCACAGCTCAAGACG CTGGAAAGTATTATTGTCACCGTGGCAACCTGAC CATGTCATTCCACCTGGAGATCACTGCTCGGCCA GTACTATGGCACTGGCTGCTGAGGACTGGTGGC TGGAAGGTCTCAGCTGTGACTTTGGCTTATCTGA TCTTCTGCCTGTGTTCCCTTGTGGGCATTCTTCAT CTTCAAAGAGCCCTGGTCCTGAGGAGGAAAAGAA AGCGAATGACTGACCCCACCAGGAGATTC	MPPPRLLFFLLFLTPMEV RPEEPLVVKVEEGDNAV LQCLKGTSDGPTQQLT WSRESPLKPFLKLSLGL PGLGIHMRPLAIWLFIFN VSQQMGGFYLCQPGPP SEKAWQPGWTVNVEGS GELFRWNVSDLGGLGC GLKNRSSEGPSSPSGKL MSPKLYVWAKDRPEIWE GEPPCLPPRDSLNQSLS QDLTMAPGSTLWLSCG VPPDSVSRGPLSWTHV HPKGPKSLLSLELKDDR PARDMWVMETGLLLPR ATAQDAGKYYCHRGNL TMSFHLEITARPVLWHW LLRTGGWKVSAVTLAYLI FCLCSLVGILHLQRALVL RRKRKRMTDPTRRF
GSG (enlazador)	GGGAGTGGG	GSG
P2A	GCTACGAATTTTAGCTTGCTGAAGCAGGCCGGTG ATGTGGAAGAGAACCCCGGGCCT	ATNFSLLKQAGDVEENP GP

(continuación)

Fragmento	Nucleótido	Péptido
FRBI	TGGCATGAAGGTCTGGAAGAAGCTTCTCGCCTTT ATTTTGGCGAACGGAACGTAAAAGGTATGTTTGA AGTCCTGGAGCCATTGCACGCCATGATGGAGCG CGGGCCTCAGACCCTCAAGGAAACCAGTTTTAAT CAGGCCTATGGGCGAGACCTCATGGAGGCACAG GAATGGTGTCGGAAGTATATGAAGTCCGGCAACG TTAAGGATCTCTTGCAGGCCTGGGACTTGTATTAT CACGTGTTCCGGCGAATCAGCAAG	WHEGLEEASRLYFGER NVKGMFEVLEPLHAMM ERGPQTLKETSFNQAYG RDLMEAQEWCRKYMKS GNVKDLLQAWDLYYHVF RRISK
Enlazador	Cgtacg	RT
FRBI'	TGGCAcGAAGGTCTgGAcGAGGCTAGTAGACTGT ATTTCGGCGAGAGAAATGTAAAGGGAATGTTCGA GGTACTGGAGCCTCTGCACGCCATGATGGAACG CGGCCCTCAGACACTCAAGGAGACTAGTTTTAAC CAGGCCTATGGCAGGGATCTGATGGAGGCTCAG GAATGGTGCCGGAAGTAtATGAAAAGCGGTAACG TGAAGGACCTGCTGCAGGCCTGGGATCTGTATTA TCACGTGTTTAGAAGAATCTCTAAA	WHEGLDEASRLYFGER NVKGMFEVLEPLHAMM ERGPQTLKETSFNQAYG RDLMEAQEWCRKYMKS GNVKDLLQAWDLYYHVF RRISK
Enlazador	Cgtacg	RT
FRBI"	TGGCACGAAGGTTTGGAAGAGGCCTCCCGCCTG TATTTCGGTGAGAGAAATGTCAAAGGTATGTTTGA AGTGCTTGAGCCCCTGCACGCCATGATGGAACG GGGGCCGCAGACTCTGAAAGAAACCTCATTCAAC CAGGCATACGGGCGAGACCTGATGGAAGCGCAG GAATGGTGTAGGAAGTACATGAAGTCCGGAAATG TGAAGGACTTGCTCCAGGCTTGGGACCTGTACTA TCACGTATTTCGGAGAATAAGCAAG-TAA	WHEGLEEASRLYFGER NVKGMFEVLEPLHAMM ERGPQTLKETSFNQAYG RDLMEAQEWCRKYMKS GNVKDLLQAWDLYYHVF RRISK*

pBP0655--pSFG-ΔMyr.FRB$_I$.MC.2A-ΔCD19

Fragmento	Nucleótido	Péptido
FRB$_I$'	TGGCACGAGGGGCTGGAGGAGGCAAGTCGACTGT ATTTTGGAGAACGCAACGTAAAGGGAATGTTTGAG GTGCTCGAACCACTCCATGCTATGATGGAAAGGGG GCCTCAGACTCTTAAGGAAACAAGTTTTAATCAAGC CTACGGACGAGACCTCATGGAGGCGCAGGAGTGG TGCAGAAAATACATGAAATCAGGTAATGTTAAGGAC CTGCTGCAGGCATGGGACCTGTACTACCATGTCTT CAGGCGCATCTCAAAG	WHEGLEEASRLYFGER NVKGMFEVLEPLHAMM ERGPQTLKETSFNQAYG RDLMEAQEWCRKYMKS GNVKDLLQAWDLYYHVF RRISK

(continuación)

Fragmento	Nucleótido	Péptido
Enlazador	ATGCATTCTGGTGGAGGATCAGGCGTTGAA	MHSGGGSGVE
MyD88L	GCAGCTGGAGGCCCTGGCGCAGGCTCTGCAGCCC	AAGGPGAGSAAPVSST
	CTGTATCTAGCACCTCTTCTCTTCCTCTGGCTGCGC	SSLPLAALNMRVRRRLS
	TGAACATGAGAGTGCGGAGACGGTTGTCTTTGTTC	LFLNVRTQVAADWTALA
	TTGAATGTCAGAACACAGGTTGCAGCGGACTGGAC	EEMDFEYLEIRQLETQA
	CGCTCTGGCCGAGGAAATGGACTTCGAGTACCTGG	DPTGRLLDAWQGRPGA
	AGATCAGGCAACTCGAAACGCAGGCAGATCCTACA	SVGRLLDLLTKLGRDDV
	GGCAGACTGTTGGATGCGTGGCAGGGACGGCCCG	LLELGPSIEEDCQKYILK
	GAGCCAGCGTTGGACGGCTCCTTGATCTTCTCACC	QQQEEAEKPLQVAAVD
	AAGCTGGGCAGAGATGACGTGCTGCTGGAATTGG	SSVPRTAELAGITTLDDP
	GCCCCAGTATTGAGGAGGACTGCCAAAAATACATC	LGHMPERFDAFICYCPS
	TTGAAGCAGCAACAGGAGGAGGCGGAGAAGCCCC	DI
	TCCAGGTCGCAGCCGTCGATTCATCCGTGCCTAGA	
	ACAGCCGAACTTGCAGGCATCACTACCCTGGATGA	
	TCCCCTGGGCCATATGCCAGAGAGGTTTGATGCGT	
	TTATCTGCTATTGCCCAAGCGATATC	
Enlazador	GTTGAG	VE
hCD40	AAGAAGGTGGCCAAGAAGCCAACCAATAAAGCTCC	KKVAKKPTNKAPHPKQE
	ACATCCTAAACAGGAGCCACAAGAAATCAACTTTCC	PQEINFPDDLPGSNTAA
	AGATGATCTCCCTGGCTCTAATACTGCAGCCCCCG	PVQETLHGCQPVTQED
	TGCAGGAAACCCTGCACGGCTGTCAACCTGTGACA	GKESRISVQERQ
	CAGGAAGACGGGAAGGAAAGCAGGATATCCGTGC	
	AGGAACGGCAA	
Enlazador	GTCGAC	VD
Epítopo de HA	TACCCATACGACGTGCCAGATTATGCT	YPYDVPDYA
Enlazador	CCGCGG;	PR
T2A	GAAGGCCGAGGGAGCCTGCTGACATGTGGCGATG	EGRGSLLTCGDVEENP
	TGGAGGAAAACCCAGGACCA	GP
Δ CD19	ATGCCACCACCTCGCCTGCTGTTCTTTCTGCTGTTC	MPPPRLLFFLLFLTPMEV
	CTGACACCTATGGAGGTGCGACCTGAGGAACCACT	RPEEPLVVKVEEGDNAV

(continuación)

Fragmento	Nucleótido	Péptido
	GGTCGTGAAGGTCGAGGAAGGCGACAATGCCGTG	LQCLKGTSDGPTQQLT
	CTGCAGTGCCTGAAAGGCACTTCTGATGGGCCAAC	WSRESPLKPFLKLSLGL
	TCAGCAGCTGACCTGGTCCAGGGAGTCTCCCCTGA	PGLGIHMRPLAIWLFIFN
	AGCCTTTTCTGAAACTGAGCCTGGGACTGCCAGGA	VSQQMGGFYLCQPGPP
	CTGGGAATCCACATGCGCCCTCTGGCTATCTGGCT	SEKAWQPGWTVNVEGS
	GTTCATCTTCAACGTGAGCCAGCAGATGGGAGGAT	GELFRWNVSDLGGLGC
	TCTACCTGTGCCAGCCAGGACCACCATCCGAGAAG	GLKNRSSEGPSSPSGKL
	GCCTGGCAGCCTGGATGGACCGTCAACGTGGAGG	MSPKLYVWAKDRPEIWE
	GGTCTGGAGAACTGTTTAGGTGGAATGTGAGTGAC	GEPPCLPPRDSLNQSLS
	CTGGGAGGACTGGGATGTGGGCTGAAGAACCGCT	QDLTMAPGSTLWLSCG
	CCTCTGAAGGCCCAAGTTCACCCTCAGGGAAGCTG	VPPDSVSRGPLSWTHV
	ATGAGCCCAAAACTGTACGTGTGGGCCAAAGATCG	HPKGPKSLLSLELKDDR
	GCCCGAGATCTGGGAGGGAGAACCTCCATGCCTG	PARDMWVMETGLLLPR
	CCACCTAGAGACAGCCTGAATCAGAGTCTGTCACA	ATAQDAGKYYCHRGNL
	GGATCTGACAATGGCCCCCGGGTCCACTCTGTGG	TMSFHLEITARPVLWHW
	CTGTCTTGTGGAGTCCCACCCGACAGCGTGTCCAG	LLRTGGWKVSAVTLAYLI
	AGGCCCTCTGTCCTGGACCCACGTGCATCCTAAGG	FCLCSLVGILHLQRALVL
	GGCCAAAAAGTCTGCTGTCACTGGAACTGAAGGAC	RRKRKRMTDPTRRF*
	GATCGGCCTGCCAGAGACATGTGGGTCATGGAGA	
	CTGGACTGCTGCTGCCACGAGCAACCGCACAGGA	
	TGCTGGAAAATACTATTGCCACCGGGGCAATCTGA	
	CAATGTCCTTCCATCTGGAGATCACTGCAAGGCCC	
	GTGCTGTGGCACTGGCTGCTGCGAACCGGAGGAT	
	GGAAGGTCAGTGCTGTGACACTGGCATATCTGATC	
	TTTTGCCTGTGCTCCCTGGTGGGCATTCTGCATCT	
	GCAGAGAGCCCTGGTGCTGCGGAGAAAGAGAAAG	
	AGAATGACTGACCCAACAAGAAGGTTTTGA	

pBP0498--pSFG-ΔMyr.iMC.FRBi2.P2A-ΔCD19

Fragmento	Nucleótido	Péptido
Inicio	ATGCTCGAG	MLE
FRBi^	TGGCACGAGGGGCTGGAGGAGGCAAGTCGACTGT ATTTTGGAGAACGCAACGTAAAGGGAATGTTTGAG GTGCTCGAACCACTCCATGCTATGATGGAAAGGGG	WHEGLEEASRLYFGER NVKGMFEVLEPLHAMM ERGPQTLKETSFNQAYG
	GCCTCAGACTCTTAAGGAAACAAGTTTTAATCAAGC CTACGGACGAGACCTCATGGAGGCGCAGGAGTGG TGCAGAAAATACATGAAATCAGGTAATGTTAAGGAC CTGCTGCAGGCATGGGACCTGTACTACCATGTCTT CAGGCGCATCTCAAAG	RDLMEAQEWCRKYMKS GNVKDLLQAWDLYYHVF RRISK
Enlazador	ATGCAT	MH
FRBi^^	TGGCACGAAGGCCTGGAAGAGGCCTCAAGACTTTA CTTTGGTGAACGCAACGTTAAAGGCATGTTCGAGG TGCTGGAACCCTTGCATGCAATGATGGAGCGAGGT CCTCAGACACTCAAAGAGACATCTTTTAACCAGGC GTATGGACGGGACCTCATGGAGGCTCAGGAATGG TGCCGCAAGTACATGAAAAGTGGGAATGTGAAGGA TCTGCTGCAAGCATGGGATCTGTATTACCACGTGTT TAGACGGATCAGCAAA	WHEGLEEASRLYFGER NVKGMFEVLEPLHAMM ERGPQTLKETSFNQAYG RDLMEAQEWCRKYMKS GNVKDLLQAWDLYYHVF RRISK
Enlazador	ATGCATTCTGGTGGAGGATCAGGCGTTGAA	MHSGGGSGVE
MyD88L	GCAGCTGGAGGCCCTGGCGCAGGCTCTGCAGCCC CTGTATCTAGCACCTCTTCTCTTCCTCTGGCTGCGC TGAACATGAGAGTGCGGAGACGGTTGTCTTTGTTC TTGAATGTCAGAACACAGGTTGCAGCGGACTGGAC CGCTCTGGCCGAGGAAATGGACTTCGAGTACCTGG AGATCAGGCAACTCGAAACGCAGGCAGATCCTACA GGCAGACTGTTGGATGCGTGGCAGGGACGGCCCG GAGCCAGCGTTGGACGGCTCCTTGATCTTCTCACC AAGCTGGGCAGAGATGACGTGCTGCTGGAATTGG GCCCCAGTATTGAGGAGGACTGCCAAAAATACATC TTGAAGCAGCAACAGGAGGAGGCGGAGAAGCCCC TCCAGGTCGCAGCCGTCGATTCATCCGTGCCTAGA ACAGCCGAACTTGCAGGCATCACTACCCTGGATGA TCCCCTGGGCCATATGCCAGAGAGGTTTGATGCGT TTATCTGCTATTGCCCAAGCGATATC	AAGGPGAGSAAPVSST SSLPLAALNMRVRRRLS LFLNVRTQVAADWTALA EEMDFEYLEIRQLETQA DPTGRLLDAWQGRPGA SVGRLLDLLTKLGRDDV LLELGPSIEEDCQKYILK QQQEEAEKPLQVAAVD SSVPRTAELAGITTLDDP LGHMPERFDAFICYCPS DI

(continuación)

Fragmento	Nucleótido	Péptido
Enlazador	GTTGAG	VE
hCD40	AAGAAGGTGGCCAAGAAGCCAACCAATAAAGCTCC ACATCCTAAACAGGAGCCACAAGAAATCAACTTTCC AGATGATCTCCCTGGCTCTAATACTGCAGCCCCCG TGCAGGAAACCCTGCACGGCTGTCAACCTGTGACA CAGGAAGACGGGAAGGAAAGCAGGATATCCGTGC AGGAACGGCAA	KKVAKKPTNKAPHPKQE PQEINFPDDLPGSNTAA PVQETLHGCQPVTQED GKESRISVQERQ
Enlazador	GTCGAC	VD
HA	TACCCATACGACGTGCCAGATTATGCT	YPYDVPDYA
Enlazador	CCGCGG	PR
T2A	GAAGGCCGAGGGAGCCTGCTGACATGTGGCGATG TGGAGGAAAACCCAGGACCA	EGRGSLLTCGDVEENP GP
ΔCD19	ATGCCACCACCTCGCCTGCTGTTCTTTCTGCTGTTC CTGACACCTATGGAGGTGCGACCTGAGGAACCACT GGTCGTGAAGGTCGAGGAAGGCGACAATGCCGTG CTGCAGTGCCTGAAAGGCACTTCTGATGGGCCAAC TCAGCAGCTGACCTGGTCCAGGGAGTCTCCCCTGA AGCCTTTTCTGAAACTGAGCCTGGGACTGCCAGGA CTGGGAATCCACATGCGCCCTCTGGCTATCTGGCT GTTCATCTTCAACGTGAGCCAGCAGATGGGAGGAT TCTACCTGTGCCAGCCAGGACCACCATCCGAGAAG GCCTGGCAGCCTGGATGGACCGTCAACGTGGAGG GGTCTGGAGAACTGTTTAGGTGGAATGTGAGTGAC CTGGGAGGACTGGGATGTGGGCTGAAGAACCGCT CCTCTGAAGGCCCAAGTTCACCCTCAGGGAAGCTG ATGAGCCCAAAACTGTACGTGTGGGCCAAAGATCG GCCCGAGATCTGGGAGGGAGAACCTCCATGCCTG CCACCTAGAGACAGCCTGAATCAGAGTCTGTCACA GGATCTGACAATGGCCCCCGGGTCCACTCTGTGG CTGTCTTGTGGAGTCCCACCCGACAGCGTGTCCAG AGGCCCTCTGTCCTGGACCCACGTGCATCCTAAGG GGCCAAAAAGTCTGCTGTCACTGGAACTGAAGGAC GATCGGCCTGCCAGAGACATGTGGGTCATGGAGA CTGGACTGCTGCTGCCACGAGCAACCGCACAGGA TGCTGGAAAATACTATTGCCACCGGGGCAATCTGA CAATGTCCTTCCATCTGGAGATCACTGCAAGGCCC GTGCTGTGGCACTGGCTGCTGCGAACCGGAGGAT GGAAGGTCAGTGCTGTGACACTGGCATATCTGATC TTTTGCCTGTGCTCCCTGGTGGGCATTCTGCATCT GCAGAGAGCCCTGGTGCTGCGGAGAAAGAGAAAG AGAATGACTGACCCAACAAGAAGGTTTTGA	MPPPRLLFFLLFLTPMEV RPEEPLVVKVEEGDNAV LQCLKGTSDGPTQQLT WSRESPLKPFLKLSLGL PGLGIHMRPLAIWLFIFN VSQQMGGFYLCQPGPP SEKAWQPGWTVNVEGS GELFRWNVSDLGGLGC GLKNRSSEGPSSPSGKL MSPKLYVWAKDRPEIWE GEPPCLPPRDSLNQSLS QDLTMAPGSTLWLSCG VPPDSVSRGPLSWTHV HPKGPKSLLSLELKDDR PARDMWVMETGLLLPR ATAQDAGKYYCHRGNL TMSFHLEITARPVLWHW LLRTGGWKVSAVTLAYLI FCLCSLVGILHLQRALVL RRKRKRMTDPTRRF*

pBP0488--pSFG-aHER2.Q.8stm.CD3zeta.Fpk2

Fragmento	Nucleótido	Péptido
Péptido de señal	ATGGAGTTTGGACTTTCTTGGTTGTTTTTGGTGGCA	MEFGLSWLFLVAILKGV
	ATTCTGAAGGGTGTCCAGTGTAGCAGG	QCSR
FRP5-VL	GACATCCAATTGACACAATCACACAAATTTCTCTCA	DIQLTQSHKFLSTSVGD
	ACTTCTGTAGGAGACAGAGTGAGCATAACCTGCAA	RVSITCKASQDVYNAVA
	AGCATCCCAGGACGTGTACAATGCTGTGGCTTGGT	WYQQKPGQSPKLLIYSA
	ACCAACAGAAGCCTGGACAATCCCCAAAATTGCTG	SSRYTGVPSRFTGSGS
	ATTTATTCTGCCTCTAGTAGGTACACTGGGGTACCT	GPDFTFTISSVQAEDLAV
	TCTCGGTTTACGGGCTCTGGGTCCGGACCAGATTT	YFCQQHFRTPFTFGSGT
	CACGTTCACAATCAGTTCCGTTCAAGCTGAAGACCT	KLEIKAL
	CGCTGTTTATTTTTGCCAGCAGCACTTCCGAACCCC	
	TTTTACTTTTGGCTCAGGCACTAAGTTGGAAATCAA	
	GGCTTTG	
Enlazador	GGCGGAGGAAGCGGAGGTGGGGGC	GGGSGGGG
FRP5-VH	GAAGTCCAATTGCAACAGTCAGGCCCCGAATTGAA	EVQLQQSGPELKKPGET
	AAAGCCCGGCGAAACAGTGAAGATATCTTGTAAAG	VKISCKASGYPFTNYGM
	CCTCCGGTTACCCTTTTACGAACTATGGAATGAACT	NWVKQAPGQGLKWMG
	GGGTCAAACAAGCCCCCTGGACAGGGATTGAAGTG	WINTSTGESTFADDFKG
	GATGGGATGGATCAATACATCAACAGGCGAGTCTA	RFDFSLETSANTAYLQIN
	CCTTCGCAGATGATTTCAAAGGTCGCTTTGACTTCT	NLKSEDMATYFCARWE
	CACTGGAGACCAGTGCAAATACCGCCTACCTTCAG	VYHGYVPYWGQGTTVT
	ATTAACAATCTTAAAAGCGAGGATATGGCAACCTAC	VSS
	TTTTGCGCAAGATGGGAAGTTTATCACGGGTACGT	
	GCCATACTGGGGACAAGGAACGACAGTGACAGTTA	
	GTAGC	

(continuación)

Fragmento	Nucleótido	Péptido
Enlazador	GGATCC	GS
Q-Bend-10 (Epítopo de CD34)	GAACTTCCTACTCAGGGGACTTTCTCAAACGTTAGC ACAAACGTAAGT	ELPTQGTFSNVSTNVS
Tallo de CD8	CCCGCCCCAAGACCCCCCACACCTGCGCCGACCA TTGCTTCTCAACCCCTGAGTTTGAGACCCGAGGCC TGCCGGCCAGCTGCCGGCGGGGCCGTGCATACAA GAGGACTCGATTTCGCTTGCGAC	PAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACD
CD8a tm	ATCTATATCTGGGCACCTCTCGCTGGCACCTGTGG AGTCCTTCTGCTCAGCCTGGTTATTACTCTGTACTG TAATCACCGGAATCGCCGCCGCGTTTGTAAGTGTC CCAGG	IYIWAPLAGTCGVLLLSL VITLYCNHRNRRRVCKC PR
Enlazador	CTCGAG	LE
CD3 zeta	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCG CGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAG CTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTT GGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGG GGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCC TGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAG GCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCC GGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGG TCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCC TTCACATGCAAGCTCTTCCACCTCG	RVKFSRSADAPAYQQG QNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKP RRKNPQEGLYNELQKD KMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATK DTYDALHMQALPP
Enlazador	TCAGGCGGTGGCTCAGGTGTTAAC	SGGGSGVN

(continuación)

Fragmento	Nucleótido	Péptido
Fpk'	GGCGTCCAAGTCGAAACCATTAGTCCCGGCGATGG	GVQVETISPGDGRTFPK
	CAGAACATTTCCTAAAAGGGGACAAACATGTGTCG	RGQTCVVHYTGMLEDG
	TCCATTATACAGGCATGTTGGAGGACGGCAAAAAG	KKFDSSRDRNKPFKFML
	TTCGACAGTAGTAGAGATCGCAATAAACCTTTCAAA	GKQEVIRGWEEGVAQM
	TTCATGTTGGGAAAACAAGAAGTCATTAGGGGATG	SVGQRAKLTISPDYAYG
	GGAGGAGGGCGTGGCTCAAATGTCCGTCGGCCAA	ATGHPPKIPPHATLVFDV
	CGCGCTAAGCTCACCATCAGCCCCGACTACGCATA	ELLKLE
	CGGCGCTACCGGACATCCCCCTAAGATTCCCCCTC	
	ACGCTACCTTGGTGTTTGACGTCGAACTGTTGAAG	
	CTCGAA	
Enlazador	GTTAAC	VN
Fpk	GGAGTGCAGGTGGAGACTATCTCCCCAGGAGACG	GVQVETISPGDGRTFPK
	GGCGCACCTTCCCCAAGCGCGGCCAGACCTGCGT	RGQTCVVHYTGMLEDG
	GGTGCACTACACCGGGATGCTTGAAGATGGAAAGA	KKFDSSRDRNKPFKFML
	AATTCGATTCCTCTCGGGACAGAAACAAGCCCTTTA	GKQEVIRGWEEGVAQM
	AGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCGAGGC	SVGQRAKLTISPDYAYG
	TGGGAAGAAGGGGTTGCCCAGATGAGTGTGGGTC	ATGHPPKIPPHATLVFDV
	AGAGAGCCAAACTGACTATATCTCCAGATTATGCCT	ELLKLE
	ATGGTGCCACTGGGCACCCACCTAAGATCCCACCA	
	CATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAAA	
	CTGGAA	
Enlazador GSG	GGATCGGGA	GSG
P2A	GCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGA	ATNFSLLKQAGDVEENP
	CGTGGAGGAGAACCCCGGGCCT	GP

pBP0467--pSH1-FRBI'.FRBI.LS.ΔCaspasa9

Fragmento	Nucleótido	Péptido
FRBi'	TGGCATGAAGGCCTGGAAGAGGCATCTCGTTTGTA	WHEGLEEASRLYFGER
	CTTTGGGGAAAGGAACGTGAAAGGCATGTTTGAGG	NVKGMFEVLEPLHAMM
	TGCTGGAGCCCTTGCACGCTATGATGGAACGGGG	ERGPQTLKETSFNQAYG
	CCCCCAGACTCTGAAGGAAACATCCTTTAATCAGG	RDLMEAQEWCRKYMKS
	CCTATGGTCGAGATTTAATGGAGGCCCAAGAGTGG	GNVKDLLQAWDLYYHVF
	TGCAGGAAGTACATGAAATCAGGGAATGTCAAGGA	RRISK
	CCTCCTCCAAGCCTGGGACCCTCTATTATCATGTGTT	
	CCGACGAATCTCAAAG	
Enlazador	GTCGAG	VE
FRBi	TGGCATGAAGGGTTGGAAGAAGCTTCAAGGCTGTA	WHEGLEEASRLYFGER
	CTTCGGAGAGAGGAACGTGAAGGGCATGTTTGAG	NVKGMFEVLEPLHAMM
	GTTCTTGAACCTCTGCACGCCATGATGGAACGGGG	ERGPQTLKETSFNQAYG
	ACCGCAGACACTGAAAGAAACCTCTTTTAATCAGG	RDLMEAQEWCRKYMKS
	CCTACGGCAGAGACCTGATGGAGGCCCAAGAATG	GNVKDLLQAWDLYYHVF
	GTGTAGAAAGTATATGAAATCCGGTAACGTGAAAG	RRISK
	ACCTGCTCCAGGCCTGGGACCTTTATTACCATGTG	
	TTCAGGCGGATCAGTAAG	
Enlazador	TCAGGCGGTGGCTCAGGT	SGGGSG
ΔCaspasa9	GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGAG	VDGFGDVGALESLRGN
	TTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTTACATCCTGA	ADLAYILSMEPCGHCLII
	GCATGGAGCCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAAC	NNVNFCRESGLRTRTGS
	AATGTGAACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCAC	NIDCEKLRRRFSSLHFM
	CCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTTGC	VEVKGDLTAKKMVLALL
	GGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAG	ELARQDHGALDCCVVVI
	GTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCT	LSHGCQASHLQFPGAVY
	GGCTTTGCTGGAGCTGGCGCgGCAGGACCACGGT	

(continuación)

Fragmento	Nucleótido	Péptido
	GCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCA	TSCPSLGGKPKLFFIQAC
	CGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGG	GGEQKDHGFEVASTSP
	GCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGTCGGT	EDESPGSNPEPDATPFQ
	CGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCT	EGLRTFDQLDAISSLPTP
	GCCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTC	SDIFVSYSTFPGFVSWR
	ATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATG	DPKSGSWYVETLDDIFE
	GGTTTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG	QWAHSEDLQSLLLRVAN
	TCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCC	AVSVKGIYKQMPGCFNF
	CGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTG	LRKKLFFKTSASRAEGR
	GACGCCATATCTAGTTTGCCCACACCCAGTGACAT	GSLLTCGDVEENPGP*
	CTTTGTGTCCTACTCTACTTTCCCAGGTTTTGTTTC	
	CTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTT	
	GAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCA	
	CTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCG	
	CTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAGA	
	TGCCTGGTTGCTTTAATTTCCTCCGGAAAAAACTTT	
	TCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAGCCGAGGGCAGG	
	GGAAGTCTTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAA	
	TCCCGGGCCCTGA	

pBP0606--pSFG-k-ΔMyr.iMC.2A-ΔCD19

Fragmento	Nucleótido	Péptido
MyD88	ATGGCTGCAGGAGGTCCCGGCGCGGGGTCTGCGG	MAAGGPGAGSAAPVSS
	CCCCGGTCTCCTCCACATCCTCCCTTCCCCTGGCT	TSSLPLAALNMRVRRRL
	GCTCTCAACATGCGAGTGCGGCGCCGCCTGTCTCT	SLFLNVRTQVAADWTAL
	GTTCTTGAACGTGCGGACACAGGTGGCGGCCGAC	AEEMDFEYLEIRQLETQ
	TGGACCGCGCTGGCGGAGGAGATGGACTTTGAGT	ADPTGRLLDAWQGRPG
	ACTTGGAGATCCGGCAACTGGAGACACAAGCGGA	ASVGRLLDLLTKLGRDD
	CCCCACTGGCAGGCTGCTGGACGCCTGGCAGGGA	VLLELGPSIEEDCQKYIL
	CGCCCTGGCGCCTCTGTAGGCCGACTGCTCGATCT	KQQQEEAEKPLQVAAV
	GCTTACCAAGCTGGGCCGCGACGACGTGCTGCTG	DSSVPRTAELAGITTLDD
	GAGCTGGGACCCAGCATTGAGGAGGATTGCCAAAA	PLGHMPERFDAFICYCP
	GTATATCTTGAAGCAGCAGCAGGAGGAGGCTGAGA	SDI
	AGCCTTTACAGGTGGCCGCTGTAGACAGCAGTGTC	
	CCACGGACAGCAGAGCTGGCGGGCATCACCACAC	
	TTGATGACCCCCTGGGGCATATGCCTGAGCGTTTC	
	GATGCCTTCATCTGCTATTGCCCCAGCGACATC	
Enlazador	GTCGAG	VG
hCD40	AAAAAGGTGGCCAAGAAGCCAACCAATAAGGCCCC	KKVAKKPTNKAPHPKQE
	CCACCCCAAGCAGGAGCCCCAGGAGATCAATTTTC	PQEINFPDDLPGSNTAA
	CCGACGATCTTCCTGGCTCCAACACTGCTGCTCCA	PVQETLHGCQPVTQED
	GTGCAGGAGACTTTACATGGATGCCAACCGGTCAC	GKESRISVQERQ
	CCAGGAGGATGGCAAAGAGAGTCGCATCTCAGTG	
	CAGGAGAGACAG	
Enlazador	GTCGAG	VG
Fv'	GGCGTCCAAGTCGAAACCATTAGTCCCGGCGATGG	GVQVETISPGDGRTFPK
	CAGAACATTTCCTAAAAGGGGACAAACATGTGTCG	RGQTCVVHYTGMLEDG
	TCCATTATACAGGCATGTTGGAGGACGGCAAAAAG	KKVDSSRDRNKPFKFML
	GTGGACAGTAGTAGAGATCGCAATAAACCTTTCAAA	GKQEVIRGWEEGVAQM
	TTCATGTTGGGAAAACAAGAAGTCATTAGGGGATG	SVGQRAKLTISPDYAYG
	GGAGGAGGGCGTGGCTCAAATGTCCGTCGGCCAA	ATGHPGIIPPHATLVFDV
	CGCGCTAAGCTCACCATCAGCCCCGACTACGCATA	ELLKLE
	CGGCGCTACCGGACATCCCGGAATTATTCCCCCTC	
	ACGCTACCTTGGTGTTTGACGTCGAACTGTTGAAG	
	CTCGAA	

(continuación)

Fragmento	Nucleótido	Péptido
Enlazador	GTCGAG	VG
Fv	GGAGTGCAGGTGGAGACTATCTCCCCAGGAGACG GGCGCACCTTCCCCAAGCGCGGCCAGACCTGCGT GGTGCACTACACCGGGATGCTTGAAGATGGAAAGA AAGTTGATTCCTCCCGGGACAGAAACAAGCCCTTT AAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCGAGG CTGGGAAGAAGGGGTTGCCCAGATGAGTGTGGGT CAGAGAGCCAAACTGACTATATCTCCAGATTATGCC TATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCATCATCCCACC ACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAA ACTGGAA	GVQVETISPGDGRTFPK RGQTCVVHYTGMLEDG KKVDSSRDRNKPFKFML GKQEVIRGWEEGVAQM SVGQRAKLTISPDYAYG ATGHPGIIPPHATLVFDV ELLKLE
Enlazador	CCGCGG	PR
T2A	GAAGGCCGAGGGAGCCTGCTGACATGTGGCGATG TGGAGGAAAACCCAGGACCA	EGRGSLLTCGDVEENP GP
ΔCD19	ATGCCACCACCTCGCCTGCTGTTCTTTCTGCTGTTC	MPPPRLLFFLLFLTPMEV
	CTGACACCTATGGAGGTGCGACCTGAGGAACCACT GGTCGTGAAGGTCGAGGAAGGCGACAATGCCGTG CTGCAGTGCCTGAAAGGCACTTCTGATGGGCCAAC TCAGCAGCTGACCTGGTCCAGGGAGTCTCCCCTGA AGCCTTTTCTGAAACTGAGCCTGGGACTGCCAGGA CTGGGAATCCACATGCGCCCTCTGGCTATCTGGCT GTTCATCTTCAACGTGAGCCAGCAGATGGGAGGAT TCTACCTGTGCCAGCCAGGACCACCATCCGAGAAG GCCTGGCAGCCTGGATGGACCGTCAACGTGGAGG GGTCTGGAGAACTGTTTAGGTGGAATGTGAGTGAC CTGGGAGGACTGGGATGTGGGCTGAAGAACCGCT CCTCTGAAGGCCCAAGTTCACCCTCAGGGAAGCTG ATGAGCCCAAAACTGTACGTGTGGGCCAAAGATCG GCCCGAGATCTGGGAGGGAGAACCTCCATGCCTG CCACCTAGAGACAGCCTGAATCAGAGTCTGTCACA GGATCTGACAATGGCCCCCGGGTCCACTCTGTGG CTGTCTTGTGGAGTCCCACCCGACAGCGTGTCCAG AGGCCCTCTGTCCTGGACCCACGTGCATCCTAAGG GGCCAAAAAGTCTGCTGTCACTGGAACTGAAGGAC GATCGGCCTGCCAGAGACATGTGGGTCATGGAGA CTGGACTGCTGCTGCCACGAGCAACCGCACAGGA TGCTGGAAAATACTATTGCCACCGGGGCAATCTGA CAATGTCCTTCCATCTGGAGATCACTGCAAGGCCC GTGCTGTGGCACTGGCTGCTGCGAACCGGAGGAT GGAAGGTCAGTGCTGTGACACTGGCATATCTGATC TTTTGCCTGTGCTCCCTGGTGGGCATTCTGCATCT GCAGAGAGCCCTGGTGCTGCGGAGAAAGAGAAAG AGAATGACTGACCCAACAAGAAGGTTTTGA	RPEEPLVVKVEEGDNAV LQCLKGTSDGPTQQLT WSRESPLKPFLKLSLGL PGLGIHMRPLAIWLFIFN VSQQMGGFYLCQPGPP SEKAWQPGWTVNVEGS GELFRWNVSDLGGLGC GLKNRSSEGPSSPSGKL MSPKLYVWAKDRPEIWE GEPPCLPPRDSLNQSLS QDLTMAPGSTLWLSCG VPPDSVSRGPLSWTHV HPKGPKSLLSLELKDDR PARDMWVMETGLLLPR ATAQDAGKYYCHRGNL TMSFHLEITARPVLWHW LLRTGGWKVSAVTLAYLI FCLCSLVGILHLQRALVL RRKRKRMTDPTRRF*

pBP0607--pSFG-k-iMC.2A-ΔCD19

Fragmento	Nucleótido	Péptido
Myr	ATGGGGAGTAGCAAGAGCAAGCCTAAGGACCCCA GCCAGCGC	MGSSKSKPKDPSQR
Enlazador	CTCGAC	LN
MyD88	ATGGCTGCAGGAGGTCCCGGCGCGGGGTCTGCG GCCCCGGTCTCCTCCACATCCTCCCTTCCCCTGG CTGCTCTCAACATGCGAGTGCGGCGCCGCCTGTC TCTGTTCTTGAACGTGCGGACACAGGTGGCGGCC GACTGGACCGCGCTGGCGGAGGAGATGGACTTT GAGTACTTGGAGATCCGGCAACTGGAGACACAAG CGGACCCCACTGGCAGGCTGCTGGACGCCTGGC AGGGACGCCCTGGCGCCTCTGTAGGCCGACTGCT CGATCTGCTTACCAAGCTGGGCCGCGACGACGTG CTGCTGGAGCTGGGACCCAGCATTGAGGAGGATT GCCAAAAGTATATCTTGAAGCAGCAGCAGGAGGA GGCTGAGAAGCCTTTACAGGTGGCCGCTGTAGAC AGCAGTGTCCCACGGACAGCAGAGCTGGCGGGC ATCACCACACTTGATGACCCCCTGGGGCATATGC CTGAGCGTTTCGATGCCTTCATCTGCTATTGCCCC AGCGACATC	MAAGGPGAGSAAPVSS TSSLPLAALNMRVRRRL SLFLNVRTQVAADWTAL AEEMDFEYLEIRQLETQ ADPTGRLLDAWQGRPG ASVGRLLDLLTKLGRDD VLLELGPSIEEDCQKYIL KQQQEEAEKPLQVAAV DSSVPRTAELAGITTLDD PLGHMPERFDAFICYCP SDI
Enlazador	GTCGAG	VG
hCD40	AAAAAGGTGGCCAAGAAGCCAACCAATAAGGCCC CCCACCCCAAGCAGGAGCCCCAGGAGATCAATTT TCCCGACGATCTTCCTGGCTCCAACACTGCTGCTC CAGTGCAGGAGACTTTACATGGATGCCAACCGGT CACCCAGGAGGATGGCAAAGAGAGTCGCATCTCA GTGCAGGAGAGACAG	KKVAKKPTNKAPHPKQE PQEINFPDDLPGSNTAA PVQETLHGCQPVTQED GKESRISVQERQ
Enlazador	GTCGAG	VG
Fv'	GGCGTCCAAGTCGAAACCATTAGTCCCGGCGATG GCAGAACATTTCCTAAAAGGGGACAAACATGTGTC GTCCATTATACAGGCATGTTGGAGGACGGCAAAA AGGTGGACAGTAGTAGAGATCGCAATAAACCTTTC AAATTCATGTTGGGAAAACAAGAAGTCATTAGGGG ATGGGAGGAGGGCGTGGCTCAAATGTCCGTCGG CCAACGCGCTAAGCTCACCATCAGCCCCGACTAC GCATACGGCGCTACCGGACATCCCGGAATTATTC CCCCTCACGCTACCTTGGTGTTTGACGTCGAACTG TTGAAGCTCGAA	GVQVETISPGDGRTFPK RGQTCVVHYTGMLEDG KKVDSSRDRNKPFKFML GKQEVIRGWEEGVAQM SVGQRAKLTISPDYAYG ATGHPGIIPPHATLVFDV ELLKLE

(continuación)

Fragmento	Nucleótido	Péptido
Enlazador	GTCGAG	VG
Fv	GGAGTGCAGGTGGAGACTATCTCCCCAGGAGACG	GVQVETISPGDGRTFPK
	GGCGCACCTTCCCCAAGCGCGGCCAGACCTGCG	RGQTCVVHYTGMLEDG
	TGGTGCACTACACCGGGATGCTTGAAGATGGAAA	KKVDSSRDRNKPFKFML
	GAAAGTTGATTCCTCCCGGGACAGAAACAAGCCC	GKQEVIRGWEEGVAQM
	TTTAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCG	SVGQRAKLTISPDYAYG
	AGGCTGGGAAGAAGGGGTTGCCCAGATGAGTGTG	ATGHPGIIPPHATLVFDV
	GGTCAGAGAGCCAAACTGACTATATCTCCAGATTA	ELLKLE
	TGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCATCATC	
	CCACCACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCT	
	TCTAAAACTGGAA	
Enlazador	CCGCGG	PR
T2A	GAAGGCCGAGGGAGCCTGCTGACATGTGGCGAT	EGRGSLLTCGDVEENP
	GTGGAGGAAAACCCAGGACCA	GP

(continuación)

Fragmento	Nucleótido	Péptido
ΔCD19	ATGCCACCACCTCGCCTGCTGTTCTTTCTGCTGTT	MPPPRLLFFLLFLTPMEV
	CCTGACACCTATGGAGGTGCGACCTGAGGAACCA	RPEEPLVVKVEEGDNAV
	CTGGTCGTGAAGGTCGAGGAAGGCGACAATGCCG	LQCLKGTSDGPTQQLT
	TGCTGCAGTGCCTGAAAGGCACTTCTGATGGGCC	WSRESPLKPFLKLSLGL
	AACTCAGCAGCTGACCTGGTCCAGGGAGTCTCCC	PGLGIHMRPLAIWLFIFN
	CTGAAGCCTTTTCTGAAACTGAGCCTGGGACTGC	VSQQMGGFYLCQPGPP
	CAGGACTGGGAATCCACATGCGCCCTCTGGCTAT	SEKAWQPGWTVNVEGS
	CTGGCTGTTCATCTTCAACGTGAGCCAGCAGATG	GELFRWNVSDLGGLGC
	GGAGGATTCTACCTGTGCCAGCCAGGACCACCAT	GLKNRSSEGPSSPSGKL
	CCGAGAAGGCCTGGCAGCCTGGATGGACCGTCAA	MSPKLYVWAKDRPEIWE
	CGTGGAGGGGTCTGGAGAACTGTTTAGGTGGAAT	GEPPCLPPRDSLNQSLS
	GTGAGTGACCTGGGAGGACTGGGATGTGGGCTG	QDLTMAPGSTLWLSCG
	AAGAACCGCTCCTCTGAAGGCCCAAGTTCACCCT	VPPDSVSRGPLSWTHV
	CAGGGAAGCTGATGAGCCCAAAACTGTACGTGTG	HPKGPKSLLSLELKDDR
	GGCCAAAGATCGGCCCGAGATCTGGGAGGGAGA	PARDMWVMETGLLLPR
	ACCTCCATGCCTGCCACCTAGAGACAGCCTGAAT	ATAQDAGKYYCHRGNL
	CAGAGTCTGTCACAGGATCTGACAATGGCCCCCG	TMSFHLEITARPVLWHW
	GGTCCACTCTGTGGCTGTCTTGTGGAGTCCCACC	LLRTGGWKVSAVTLAYLI
	CGACAGCGTGTCCAGAGGCCCTCTGTCCTGGACC	FCLCSLVGILHLQRALVL
	CACGTGCATCCTAAGGGGCCAAAAAGTCTGCTGT	RRKRKRMTDPTRRF*
	CACTGGAACTGAAGGACGATCGGCCTGCCAGAGA	
	CATGTGGGTCATGGAGACTGGACTGCTGCTGCCA	
	CGAGCAACCGCACAGGATGCTGGAAAATACTATT	
	GCCACCGGGGCAATCTGACAATGTCCTTCCATCT	
	GGAGATCACTGCAAGGCCCGTGCTGTGGCACTGG	
	CTGCTGCGAACCGGAGGATGGAAGGTCAGTGCTG	
	TGACACTGGCATATCTGATCTTTTGCCTGTGCTCC	
	CTGGTGGGCATTCTGCATCTGCAGAGAGCCCTGG	
	TGCTGCGGAGAAAGAGAAAGAGAATGACTGACCC	
	AACAAGAAGGTTTTGA	

pBP0668--pSFG-FRBIx2.Caspasa9.2A-Q.8stm.CD3zeta

Fragmento	Nucleótido	Péptido
FRBI'	TGGCATGAAGGCCTGGAAGAGGCATCTCGTTTGTA	WHEGLEEASRLYFGER
	CTTTGGGGAAAGGAACGTGAAAGGCATGTTTGAGG	NVKGMFEVLEPLHAMM
	TGCTGGAGCCCTTGCACGCTATGATGGAACGGGG	ERGPQTLKETSFNQAYG
	CCCCCAGACTCTGAAGGAAACATCCTTTAATCAGG	RDLMEAQEWCRKYMKS
	CCTATGGTCGAGATTTAATGGAGGCCCAAGAGTGG	GNVKDLLQAWDLYYHVF
	TGCAGGAAGTACATGAAATCAGGGAATGTCAAGGA	RRISK
	CCTCCTCCAAGCCTGGGACCTCTATTATCATGTGTT	
	CCGACGAATCTCAAAG	
Enlazador	GTCGAG	VG
FRBI	TGGCATGAAGGGTTGGAAGAAGCTTCAAGGCTGTA	WHEGLEEASRLYFGER
	CTTCGGAGAGAGGAACGTGAAGGGCATGTTTGAG	NVKGMFEVLEPLHAMM
	GTTCTTGAACCTCTGCACGCCATGATGGAACGGGG	ERGPQTLKETSFNQAYG
	ACCGCAGACACTGAAAGAAACCTCTTTTAATCAGG	RDLMEAQEWCRKYMKS
	CCTACGGCAGAGACCTGATGGAGGCCCAAGAATG	GNVKDLLQAWDLYYHVF
	GTGTAGAAAGTATATGAAATCCGGTAACGTGAAAG	RRISK
	ACCTGCTCCAGGCCTGGGACCTTTATTACCATGTG	
	TTCAGGCGGATCAGTAAG	

(continuación)

Fragmento	Nucleótido	Péptido
Enlazador	TCAGGCGGTGGCTCAGGT	SGGGSG
ΔCaspasa9		
	TCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGAGT	DGFGDVGALESLRGNA
	TTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTTACATCCTGAG	DLAYILSMEPCGHCLIIN
	CATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACA	NVNFCRESGLRTRTGSN
	ATGTGAACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACC	IDCEKLRRRFSSLHFMV
	CGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTTGCG	EVKGDLTAKKMVLALLE
	GCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTCATGGTGGAGG	LARQDHGALDCCVVVIL
	TGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG	SHGCQASHLQFPGAVY
	GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGTG	GTDGCPVSVEKIVNIFNG

(continuación)

Fragmento	Nucleótido	Péptido
	CTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCAC	TSCPSLGGKPKLFFIQAC
	GGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGGG	GGEQKDHGFEVASTSP
	CTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGTCGGTC	EDESPGSNPEPDATPFQ
	GAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTG	EGLRTFDQLDAISSLPTP
	CCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCA	SDIFVSYSTFPGFVSWR
	TCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGG	DPKSGSWYVETLDDIFE
	GTTTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAGT	QWAHSEDLQSLLLRVAN
	CCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCC	AVSVKGIYKQMPGCFNF
	GTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTGG	LRKKLFFKTSASRA
	ACGCCATATCTAGTTTGCCCACACCCAGTGACATCT	
	TTGTGTCCTACTCTACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCT	
	GGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGA	
	GACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACT	
	CTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCT	
	AATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAGATG	
	CCTGGTTGCTTTAATTTCCTCCGGAAAAAACTTTTC TTTAAAACATCAGCTAGCAGAGCC	
Enlazador	CCGCGG	PR
T2A	GAAGGCCGAGGGAGCCTGCTGACATGTGGCGATG	EGRGSLLTCGDVEENP
	TGGAGGAAAACCCAGGACCA	GP
Péptido de señal	ATGGAATTTGGCCTCTCCTGGTTGTTTCTCGTGGC	MEFGLSWLFLVAILKGV
	CATTCTTAAGGGTGTGCAGTGCTCCAGA	QCSR
Enlazador	ATGCAT	MH

(continuación)

Fragmento	Nucleótido	Péptido
Q-Bend (Epítopo de CD34)	GAACTTCCTACTCAGGGGACTTTCTCAAACGTTAGC	ELPTQGTFSNVSTNVS
	ACAAACGTAAGT	
Tallo de CD8	CCCGCCCCAAGACCCCCCACACCTGCGCCGACCA	PAPRPPTPAPTIASQPLS
	TTGCTTCTCAACCCCTGAGTTTGAGACCCGAGGCC	LRPEACRPAAGGAVHTR
	TGCCGGCCAGCTGCCGGCGGGGCCGTGCATACAA	GLDFACD
	GAGGACTCGATTTCGCTTGCGAC	
CD8a tm	ATCTATATCTGGGCACCTCTCGCTGGCACCTGTGG	IYIWAPLAGTCGVLLLSL
	AGTCCTTCTGCTCAGCCTGGTTATTACTCTGTACTG	VITLYCNHRNRRRVCKC
	TAATCACCGGAATCGCCGCCGCGTTTGTAAGTGTC	PRVD
	CCAGGGTCGAC	
CD3 zeta	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCG	RVKFSRSADAPAYQQG
	CGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAG	QNQLYNELNLGRREEYD
	CTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTT	VLDKRRGRDPEMGGKP
	GGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGG	RRKNPQEGLYNELQKD
	GGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCC	KMAEAYSEIGMKGERRR
	TGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAG	GKGHDGLYQGLSTATK
	GCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCC	DTYDALHMQALPP
	GGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGG	
	TCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCC	
	TTCACATGCAAGCTCTTCCACCTCG	

pBP0608--pSFG-ΔMyr.iMC.2A-ΔCD19.Q.8stm.CD3zeta

Fragmento	Nucleótido	Péptido
MyD88	ATGGCTGCAGGAGGTCCCGGCGCGGGGGTCTGCGG	MAAGGPGAGSAAPVSS
	CCCCGGTCTCCTCCACATCCTCCCTTCCCCTGGCT	TSSLPLAALNMRVRRRL
	GCTCTCAACATGCGAGTGCGGCGCCGCCTGTCTCT	SLFLNVRTQVAADWTAL
	GTTCTTGAACGTGCGGACACAGGTGGCGGCCGAC	AEEMDFEYLEIRQLETQ
	TGGACCGCGCTGGCGGAGGAGATGGACTTTGAGT	ADPTGRLLDAWQGRPG
	ACTTGGAGATCCGGCAACTGGAGACACAAGCGGA	ASVGRLLDLLTKLGRDD
	CCCCACTGGCAGGCTGCTGGACGCCTGGCAGGGA	VLLELGPSIEEDCQKYIL
	CGCCCTGGCGCCTCTGTAGGCCGACTGCTCGATCT	KQQQEEAEKPLQVAAV
	GCTTACCAAGCTGGGCCGCGACGACGTGCTGCTG	DSSVPRTAELAGITTLDD
	GAGCTGGGACCCAGCATTGAGGAGGATTGCCAAAA	PLGHMPERFDAFICYCP
	GTATATCTTGAAGCAGCAGCAGGAGGAGGCTGAGA	SDI
	AGCCTTTACAGGTGGCCGCTGTAGACAGCAGTGTC	
	CCACGGACAGCAGAGCTGGCGGGCATCACCACAC	
	TTGATGACCCCCTGGGGCATATGCCTGAGCGTTTC	
	GATGCCTTCATCTGCTATTGCCCCAGCGACATC	
Enlazador	GTCGAG	VE
hCD40	AAAAAGGTGGCCAAGAAGCCAACCAATAAGGCCCC	KKVAKKPTNKAPHPKQE
	CCACCCCAAGCAGGAGCCCCAGGAGATCAATTTTC	PQEINFPDDLPGSNTAA
	CCGACGATCTTCCTGGCTCCAACACTGCTGCTCCA	PVQETLHGCQPVTQED
	GTGCAGGAGACTTTACATGGATGCCAACCGGTCAC	GKESRISVQERQ
	CCAGGAGGATGGCAAAGAGAGTCGCATCTCAGTG	
	CAGGAGAGACAG	

(continuación)

Fragmento	Nucleótido	Péptido
Enlazador	GTCGAG	VE
Fv'	GGCGTCCAAGTCGAAACCATTAGTCCCGGCGATGG CAGAACATTTCCTAAAAGGGGACAAACATGTGTCG TCCATTATACAGGCATGTTGGAGGACGGCAAAAAG GTGGACAGTAGTAGAGATCGCAATAAACCTTTCAAA TTCATGTTGGGAAAACAAGAAGTCATTAGGGGATG GGAGGAGGGCGTGGCTCAAATGTCCGTCGGCCAA CGCGCTAAGCTCACCATCAGCCCCGACTACGCATA CGGCGCTACCGGACATCCCGGAATTATTCCCCCTC ACGCTACCTTGGTGTTTGACGTCGAACTGTTGAAG CTCGAA	GVQVETISPGDGRTFPK RGQTCVVHYTGMLEDG KKVDSSRDRNKPFKFML GKQEVIRGWEEGVAQM SVGQRAKLTISPDYAYG ATGHPGIIPPHATLVFDV ELLKLE
Enlazador	GTCGAG	VE
Fv	GGAGTGCAGGTGGAGACTATCTCCCCAGGAGACG GGCGCACCTTCCCCAAGCGCGGCCAGACCTGCGT GGTGCACTACACCGGGATGCTTGAAGATGGAAAGA AAGTTGATTCCTCCCGGGACAGAAACAAGCCCTTT AAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCGAGG CTGGGAAGAAGGGGTTGCCCAGATGAGTGTGGGT CAGAGAGCCAAACTGACTATATCTCCAGATTATGCC TATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCATCATCCCACC ACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAA ACTGGAA	GVQVETISPGDGRTFPK RGQTCVVHYTGMLEDG KKVDSSRDRNKPFKFML GKQEVIRGWEEGVAQM SVGQRAKLTISPDYAYG ATGHPGIIPPHATLVFDV ELLKLE
Enlazador	CCGCGG	PR
T2A	GAAGGCCGAGGGAGCCTGCTGACATGTGGCGATG TGGAGGAAAACCCAGGACCA	EGRGSLLTCGDVEENP GP

(continuación)

Fragmento	Nucleótido	Péptido
Enlazador	CCATGG	PW
Péptido de señal	ATGGAGTTTGGACTTTCTTGGTTGTTTTTGGTGGCA ATTCTGAAGGGTGTCCAGTGTAGCAGG	MEFGLSWLFLVAILKGV QCSR
FMC63-VL	GACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTC TGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCA GGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAATTGGT ATCAGCAGAAACCAGATGGAACTGTTAAACTCCTG ATCTACCATACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCA TCAAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTA TTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATAT TGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCC GTACACGTTCGGAGGGGGGACTAAGTTGGAAATAA CA	DIQMTQTTSSLSASLGD RVTISCRASQDISKYLN WYQQKPDGTVKLLIYHT SRLHSGVPSRFSGSGS GTDYSLTISNLEQEDIAT YFCQQGNTLPYTFGGG TKLEIT
Enlazador flexible	GGCGGAGGAAGCGGAGGTGGGGGC	GGGSGGGG
FMC63-VH	GAGGTGAAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGG TGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCGTCACATGCACT GTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAG CTGGATTCGCCAGCCTCCACGAAAGGGTCTGGAGT GGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAAACCACATAC TATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGACCATCATC AAGGACAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATG AACAGTCTGCAAACTGATGACACAGCCATTTACTAC TGTGCCAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCT ATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGT CTCCTCA	EVKLQESGPGLVAPSQS LSVTCTVSGVSLPDYGV SWIRQPPRKGLEWLGVI WGSETTYYNSALKSRLT IIKDNSKSQVFLKMNSLQ TDDTAIYYCAKHYYYGG SYAMDYWGQGTSVTVS S

(continuación)

Fragmento	Nucleótido	Péptido
Enlazador	GGATCC	GS
Q-Bend (Epítopo de CD34)	GAACTTCCTACTCAGGGGACTTTCTCAAACGTTAGC ACAAACGTAAGT	ELPTQGTFSNVSTNVS
Tallo de CD8	CCCGCCCCAAGACCCCCCACACCTGCGCCGACCA TTGCTTCTCAACCCCTGAGTTTGAGACCCGAGGCC TGCCGGCCAGCTGCCGGCGGGGCCGTGCATACAA GAGGACTCGATTTCGCTTGCGAC	PAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACD
CD8a tm	ATCTATATCTGGGCACCTCTCGCTGGCACCTGTGG AGTCCTTCTGCTCAGCCTGGTTATTACTCTGTACTG TAATCACCGGAATCGCCGCCGCGTTTGTAAGTGTC CCAGG	IYIWAPLAGTCGVLLLSL VITLYCNHRNRRRVCKC PR
Enlazador	GTCGAC	VD
CD3 zeta	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCG CGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAG CTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTT GGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGG GGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCC TGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAG GCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCC GGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGG TCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCC TTCACATGCAAGCTCTTCCACCTCG	RVKFSRSADAPAYQQG QNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKP RRKNPQEGLYNELQKD KMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATK DTYDALHMQALPP

pBP0609: pSFG-iMC.2A-ΔCD19.Q.8stm.CD3zeta

Fragmento	Nucleótido	Péptido
Myr	ATGGGGAGTAGCAAGAGCAAGCCTAAGGACCCCA GCCAGCGC	MGSSKSKPKDPSQR
Enlazador	CTCGAC	LD
MyD88	ATGGCTGCAGGAGGTCCCGGCGCGGGGGTCTGCGG CCCCGGTCTCCTCCACATCCTCCCTTCCCCTGGCT GCTCTCAACATGCGAGTGCGGCGCCGCCTGTCTCT GTTCTTGAACGTGCCGGACACAGGTGGCGGCCGAC TGGACCGCGCTGGCGGAGGAGATGGACTTTGAGT ACTTGGAGATCCGGCAACTGGAGACACAAGCGGA CCCCACTGGCAGGCTGCTGGACGCCTGGCAGGGA CGCCCTGGCGCCTCTGTAGGCCGACTGCTCGATCT GCTTACCAAGCTGGGCCGCGACGACGTGCTGCTG GAGCTGGGACCCAGCATTGAGGAGGATTGCCAAAA GTATATCTTGAAGCAGCAGCAGGAGGAGGCTGAGA AGCCTTTACAGGTGGCCGCTGTAGACAGCAGTGTC CCACGGACAGCAGAGCTGGCGGGCATCACCACAC TTGATGACCCCCTGGGGCATATGCCTGAGCGTTTC GATGCCTTCATCTGCTATTGCCCCAGCGACATC	MAAGGPGAGSAAPVSS TSSLPLAALNMRVRRRL SLFLNVRTQVAADWTAL AEEMDFEYLEIRQLETQ ADPTGRLLDAWQGRPG ASVGRLLDLLTKLGRDD VLLELGPSIEEDCQKYIL KQQQEEAEKPLQVAAV DSSVPRTAELAGITTLDD PLGHMPERFDAFICYCP SDI

(continuación)

Fragmento	Nucleótido	Péptido
Enlazador	GTCGAG	VE
hCD40	AAAAAGGTGGCCAAGAAGCCAACCAATAAGGCCCC	KKVAKKPTNKAPHPKQE
	CCACCCCAAGCAGGAGCCCCAGGAGATCAATTTTC	PQEINFPDDLPGSNTAA
	CCGACGATCTTCCTGGCTCCAACACTGCTGCTCCA	PVQETLHGCQPVTQED
	GTGCAGGAGACTTTACATGGATGCCAACCGGTCAC	GKESRISVQERQ
	CCAGGAGGATGGCAAAGAGAGTCGCATCTCAGTG	
	CAGGAGAGACAG	
Enlazador	GTCGAG	VE
Fv'	GGCGTCCAAGTCGAAACCATTAGTCCCGGCGATGG	GVQVETISPGDGRTFPK
	CAGAACATTTCCTAAAAGGGGACAAACATGTGTCG	RGQTCVVHYTGMLEDG
	TCCATTATACAGGCATGTTGGAGGACGGCAAAAAG	KKVDSSRDRNKPFKFML
	GTGGACAGTAGTAGAGATCGCAATAAACCTTTCAAA	GKQEVIRGWEEGVAQM
	TTCATGTTGGGAAAACAAGAAGTCATTAGGGGATG	SVGQRAKLTISPDYAYG
	GGAGGAGGGCGTGGCTCAAATGTCCGTCGGCCAA	ATGHPGIIPPHATLVFDV
	CGCGCTAAGCTCACCATCAGCCCCGACTACGCATA	ELLKLE
	CGGCGCTACCGGACATCCCGGAATTATTCCCCCTC	
	ACGCTACCTTGGTGTTTGACGTCGAACTGTTGAAG	
	CTCGAA	
Enlazador	GTCGAG	VE

(continuación)

	Nucleótido	Péptido
Fragmento Fv	GGAGTGCAGGTGGAGACTATCTCCCCAGGAGACG	GVQVETISPGDGRTFPK
	GGCGCACCTTCCCCAAGCGCGGCCAGACCTGCGT	RGQTCVVHYTGMLEDG
	GGTGCACTACACCGGGATGCTTGAAGATGGAAAGA	KKVDSSRDRNKPFKFML
	AAGTTGATTCCTCCCGGGACAGAAACAAGCCCTTT	GKQEVIRGWEEGVAQM
	AAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCGAGG	SVGQRAKLTISPDYAYG
	CTGGGAAGAAGGGGTTGCCCAGATGAGTGTGGGT	ATGHPGIIPPHATLVFDV
	CAGAGAGCCAAACTGACTATATCTCCAGATTATGCC	ELLKLE
	TATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCATCATCCCACC	
	ACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAA	
	ACTGGAA	
Enlazador	CCGCGG	PR
T2A	GAAGGCCGAGGGAGCCTGCTGACATGTGGCGATG	EGRGSLLTCGDVEENP
	TGGAGGAAAACCCAGGACCA	GP
Enlazador	CCATGG	PW
Péptido de señal	ATGGAGTTTGGACTTTCTTGGTTGTTTTTGGTGGCA	MEFGLSWLFLVAILKGV
	ATTCTGAAGGGTGTCCAGTGTAGCAGG	QCSR

(continuación)

Fragmento	Nucleótido	Péptido
FMC63-VL	GACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTC	DIQMTQTTSSLSASLGD
	TGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCA	RVTISCRASQDISKYLN
	GGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAATTGGT	WYQQKPDGTVKLLIYHT
	ATCAGCAGAAACCAGATGGAACTGTTAAACTCCTG	SRLHSGVPSRFSGSGS
	ATCTACCATACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCA	GTDYSLTISNLEQEDIAT
	TCAAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTA	YFCQQGNTLPYTFGGG
	TTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATAT	TKLEIT
	TGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCC	
	GTACACGTTCGGAGGGGGGACTAAGTTGGAAATAA	
	CA	
Enlazador flexible	GGCGGAGGAAGCGGAGGTGGGGGC	GGGSGGGG
FMC63-VH	GAGGTGAAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGG	EVKLQESGPGLVAPSQS
	TGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCGTCACATGCACT	LSVTCTVSGVSLPDYGV
	GTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAG	SWIRQPPRKGLEWLGVI
	CTGGATTCGCCAGCCTCCACGAAAGGGTCTGGAGT	WGSETTYYNSALKSRLT
	GGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAAACCACATAC	IIKDNSKSQVFLKMNSLQ
	TATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGACCATCATC	TDDTAIYYCAKHYYYGG
	AAGGACAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATG	SYAMDYWGQGTSVTVS
	AACAGTCTGCAAACTGATGACACAGCCATTTACTAC	S
	TGTGCCAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCT	
	ATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGT	
	CTCCTCA	
Enlazador	GGATCC	GS

(continuación)

Fragmento	Nucleótido	Péptido
Q-Bend (Epítopo de CD34)	GAACTTCCTACTCAGGGGACTTTCTCAAACGTTAGC ACAAACGTAAGT	ELPTQGTFSNVSTNVS
Tallo de CD8	CCCGCCCCAAGACCCCCCACACCTGCGCCGACCA TTGCTTCTCAACCCCTGAGTTTGAGACCCGAGGCC TGCCGGCCAGCTGCCGGCGGGGCCGTGCATACAA GAGGACTCGATTTCGCTTGCGAC	PAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACD
CD8a tm	ATCTATATCTGGGCACCTCTCGCTGGCACCTGTGG AGTCCTTCTGCTCAGCCTGGTTATTACTCTGTACTG TAATCACCGGAATCGCCGCCGCGTTTGTAAGTGTC CCAGG	IYIWAPLAGTCGVLLLSL VITLYCNHRNRRRVCKC PR
Enlazador	GTCGAC	VD
CD3 zeta	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCG CGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAG CTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTT GGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGG GGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCC TGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAG GCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCC GGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGG TCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCC TTCACATGCAAGCTCTTCCACCTCG	RVKFSRSADAPAYQQG QNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKP RRKNPQEGLYNELQKD KMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATK DTYDALHMQALPP

Ejemplo 24: Un interruptor de muerte celular inducible dirigido por ligandos de heterodimerización

Materiales y equipamiento

Producto	Especificaciones	Empresa	Catálogo
D-PBS	Certificado en los EE. UU.	Sigma-Aldrich	D8537
DMEM 4500	NA	Sigma-Aldrich	D5796
FBS	Grado clínico	GIBCO	26140-079
Placa de 96 pocillos	NA	Greiner	655180
DMEM	NA	Sigma-Aldrich	D5796
Rapamicina	Grado Invest.	LC Labs	R5000
Penicilina-Estreptomicina	NA	Sigma	P0781
Placa negra de 96 pocillos	NA	Greiner	655076
L-Glutamina	NA	Sigma-Aldrich	G7513
Células 293-T	Estéril	ATCC	CRL-3216
4-Metilumbeliferilfosfato (4-MUP)	NA	Sigma	M8168
Dietanolamina	NA	Sigma	D8885
GeneJuice	NA	Novagen	70967
Tripsina-EDTA	NA	Sigma-Aldrich	T4049
AP1903/Rimiducid	NA	Bellicum	NA
Isopropoxilrapamicina	NA	Bellicum	NA
OPTIMEM	NA	GIBCO	31985-070
Gel de sílice	NA	Sigma	288624
Acetato de etilo	NA	Sigma	650528
Hexanos	NA	Sigma	227064
Ácido p-toluenosulfónico	NA	Sigma	T35920

Artículo	Especificaciones	Empresa	Modelo	Número de serie
Centrífuga	NA	Thermo Scientific	Sorval Legend XFR	75004538
Microcentrifugadora	NA	Thermo Scientific	Sorval Micro 21	75002435
Espectrofotómetro	NA	Thermo	Nanodrop 2000	G900
Lector de placas de fluorescencia	NA	BMG Labtek	Polaris Omega	415 1361

MÉTODOS

Transfección de células

Se sembraron células HEK 293T (5 x 10^5) en una placa de cultivo tisular de 100 mm en 10 ml de DMEM4500, complementado con glutamina, penicilina/estreptomicina y suero fetal de ternero al 10 %. Después de 16-30 horas de incubación, se transfectaron las células usando el protocolo de GeneJuice® de Novagen. En resumen, para cada transfección, se pipetearon 0,5 ml de OptiMEM en un tubo de microcentrifugadora de 1,5 ml y se añadieron 15 µl de reactivo GeneJuice seguido de agitación vorticial durante 5 s. Se dejaron reposar las muestras 5 minutos para reposar la suspensión de GeneJuice. Se añadió ADN (5 µg en total) a cada tubo y se mezcló pipeteando hacia arriba y hacia abajo cuatro veces. Se dejaron reposar las muestras durante 5 minutos para la formación de complejos de GeneJuice-ADN y se añadió la suspensión gota a gota a una placa de células 293T. Una transfección típica contiene 1 µg de SRα-SEAP (pBP0046) (3), 2 µg de FRB-Caspasa-9 (pBP0463) y 2 µg de FKBPv12-Caspasa-9 (pBP0044) (7).

Estimulación de células con fármacos dimerizadores

24 horas después de la transfección (4.1), se separaron las células 293T en placas de 96 pocillos y se incubaron con diluciones de fármacos de dimerización. En resumen, se añadieron 100 µl de medio a cada pocillo de una placa de fondo plano de 96 pocillos. Los fármacos se diluyeron en tubos a una concentración 4X de la concentración máxima en el gradiente para colocarlos en la placa. Se añadieron 100 µl de ligando de dimerización (rimiducid, rapamicina, isopropoxilrapamicina) a cada uno de los tres pocillos en el extremo derecho de la placa (los ensayos se llevan a cabo, por tanto, por triplicado). Después, se transfirieron 100 µl de cada pocillo que contenía fármaco al pocillo adyacente y se repitió el ciclo 10 veces para producir un gradiente en etapas seriado de dos veces. Los últimos pocillos se dejaron sin tratar y sirven como control para la actividad indicadora basal. Después, se tripsinizaron las células 293 transfectadas, se lavaron con medio completo, se suspendieron en medio y se separó en alícuotas de 100 µl en cada pocillo que contenía fármaco (o sin fármaco). Las células se incubaron 24 horas.

Ensayo de actividad indicadora

El promotor SRa es un elemento transcripcional híbrido que comprende la región temprana de SV40 (que impulsa la transcripción de antígeno T) y partes (R y U5) de la repetición terminal larga (LTR) del virus linfotrófico de linfocitos T humanos (HTLV-1). Este promotor impulsa altos niveles constitutivos del gen indicador de fosfatasa alcalina secretado (SeAP). La activación de Caspasa-9 mediante dimerización da lugar rápidamente a muerte celular y aumenta la proporción de células que mueren a medida que aumentan las cantidades de fármaco. Cuando mueren las células, se detiene la transcripción y la traducción del indicador pero las proteínas indicadoras ya secretadas persisten en el medio. La pérdida de actividad de SeAP constitutiva es por tanto una aproximación eficaz para la activación dependiente de fármacos de la muerte celular.

24 horas después de la estimulación con fármaco, se envolvieron las placas de 96 pocillos para impedir la evaporación y se incubaron a 65 °C durante 2 horas para inactivar las fosfatasas endógenas y séricas, mientras que permanece el indicador de SeAP termoestable (1, 4, 12). Se cargaron muestras de 100 µl de cada pocillo en pocillos individuales de una placa de ensayo de 96 pocillos con paredes negras. Las muestras se incubaron con fosfato de 4-metilumbeliferilo (4-MUP) 0,5 mM en dietanolamina 0,5 M a pH 10,0 durante 4 a 16 horas. La actividad de fosfatasa se midió por fluorescencia con excitación a 355 nm y emisión a 460 nm. Los datos se transfirieron a una hoja de cálculo de Microsoft Excel para la tabulación y se representó gráficamente con GraphPad Prism.

Producción de isopropiloxirrapamicina

Se empleó el método de Luengo et al. ((J. Org. Chem 59:6512, (1994)), (16, 17)). En resumen, se disolvieron 20 mg de rapamicina en 3 ml de isopropanol y se añadieron 22,1 mg de ácido p-tolueno sulfónico y se incubó a temperatura ambiente con agitación durante 4-12 horas. Al completarse, se añadieron 5 ml de acetato de etilo y se extrajeron los productos cinco veces con bicarbonato de sodio saturado y 3 veces con salmuera (cloruro de sodio saturado). La fase orgánica se secó y se volvió a disolver en acetato de etilo:hexano (3:1). Los estereoisómeros y productos menores se resolvieron mediante cromatografía ultrarrápida en una columna de gel de sílice de 10 a 15 ml con 3:1 de acetato de etilo: hexano a una presión de 3-4 kPa y se secaron las fracciones. Las fracciones se ensayaron mediante espectrofotometría a 237 nM, 267 nM, 278 nM y 290 nM y se ensayó su especificidad de unión en un interruptor transcripcional específico para alelo FRB.

La dimerización directa de FRB-Caspasa con FKBP-Caspasa con rapamicina dirige la apoptosis

La dimerización de caspasas fusionadas a FKBP puede dimerizar mediante moléculas de homodimerizador, tales como AP1510, AP20187 o AP1903. Puede dirigirse un interruptor proapoptótico similar mediante heterodimerización de un interruptor binario usando rapamicina mediante coexpresión de una proteína de fusión de FRB-Caspasa-9, junto con FKBP-Caspasa-9, lo que da lugar a la homodimerización de los dominios de caspasa. En la Figura 37, se cotransfectó un plásmido indicador de SeAP constitutivamente activo en células 293T, junto con las construcciones de caspasa. Las células transfectadas produjeron SeAP de manera abundante que se midió fácilmente sin fármaco y que sirvió como patrón de normalización al 100 % en el experimento. La incubación de las dos proteínas de fusión con rimiducid produce una homodimerización dependiente de la dosis de solo FKBP12-Caspasa9, lo que da lugar a la dimerización y la activación de la apoptosis, mientras que FRB-Caspasa9 queda excluido del complejo impulsado por rimiducid (a la izquierda). Por el contrario, la incubación con rapamicina asocia directamente FRB y FKBP y los residuos de Caspasa-9 ligados se asocian y activan. La muerte celular se midió indirectamente por la pérdida de producción de indicador de SeAP a medida que mueren las células. Este experimento demostró que la heterodimerización con rapamicina produce muerte celular dependiente de la dosis, lo que revela un nuevo interruptor de seguridad con sensibilidad a fármacos nanomolar.

Figura 37 - Muerte celular programada inducida por fármacos mediante homodimerización o heterodimerización de Caspasa-9 marcada. Se transfectaron células 293T con SRα-SeAP (pBP0046), pSH1-FKBPv12-Caspasa9 (pBP0044) y pSH1-FR-B_L-Caspasa9 (pBP0463). Después de 24 horas de incubación, se separaron las células y se incubaron con concentraciones crecientes de rapamicina (en azul), rimiducid (en rojo) o etanol (el disolvente que contiene la solución madre de rapamicina). La pérdida de actividad indicadora es una aproximación para la pérdida

de viabilidad celular. La actividad indicadora se expresa como un porcentaje de la media de 8 pocillos de control que no contienen fármaco. Los ensayos con fármaco se llevaron a cabo por triplicado.

La muerte celular puede dirigirse por rapamicina o análogos de rapamicina.

La rapamicina es un eficaz agente de heterodimerización, pero debido a que causa el apilamiento de FKBP12 con la proteína quinasa mTOR, la rapamicina también es un potente inhibidor de la transducción de señales, dando como resultado una traducción de proteínas reducida y un crecimiento celular reducido. Los derivados de rapamicina en las posiciones C3 o C7 del anillo tienen afinidad reducida por mTOR pero conservan alta afinidad por mutantes en la "hélice 4" del dominio FRB. El plásmido pBP0463 contiene una mutación que sustituye la leucina por la treonina de tipo silvestre en la posición 2098 en el dominio FRB (usando la numeración de mTOR) y acomoda los derivados en C7. La incubación de células 293T transfectadas con FRB_L-Caspasa 9, $FKBP_V$12-Caspasa 9 y el indicador de SeAP constitutivo produjo un interruptor de muerte celular de alta eficacia dependiente de la dosis con rapamicina o el análogo de rapamicina (rapálogo) C7-isopropiloxirrapamicina (Figura 38).

Figura 38 - Interruptor de muerte celular inducido por rapálogo. Se transfectaron células 293T con SRα-SeAP (pBP0046), pSH1-FKBPv12-Caspasa9 (pBP0044) y pSH1-FRB_L-Caspasa9 (pBP0463). Después de 24 horas de incubación, se separaron las células y se incubaron con concentraciones crecientes de rapamicina (en azul), C7-isopropoxiloxirrapamicina (en verde) o etanol (el disolvente que contiene las soluciones madre de fármaco). La pérdida de actividad indicadora es una aproximación para la pérdida de viabilidad celular. La actividad indicadora se expresa como un porcentaje de la media de 8 pocillos que no contienen fármaco. Los ensayos que contienen fármaco se llevaron a cabo por triplicado.

La muerte celular inducida por rapamicina requiere la presencia de FRB-Caspasa-9.

Para demostrar que la muerte celular inducida por rapamicina es el resultado de la dimerización de moléculas de Caspasa-9 unidas por separado a FRB y FKBP12, se llevaron a cabo dos experimentos de control.

(Figuras 39 y 40). Se cotransfectó iC9 (FKBPv12-Caspasa-9) con un vector de control que expresa solo un marcador de epítopo (Figura 39) o un vector que contiene FRB sin fusión de caspasa, pero en cambio con un marcador corto irrelevante (Figura 40). En cada caso, la incubación con rimiducid permitió eficazmente la homodimerización y la inducción de Caspasa-9, pero la incubación con rapamicina no promovió la muerte celular. Estos hallazgos respaldan la conclusión de que el mecanismo de muerte celular mediada por rapamicina/rapálogo es la activación de moléculas C9 dimerizadas en lugar del reclutamiento de mTOR a Caspasa-9 o debido a un mecanismo indirecto que implica la inhibición de mTOR endógena.

Figura 39 - FRB-Caspasa-9 es necesario para un interruptor de muerte celular inducida por rapamicina. Se transfectaron células 293T con SRa-SeAP (pBP0046), pS-NLS-E y pSH1-FKBPv12-Caspasa9 (pBP0044).

Figura 40 - La fusión de Caspasa-9 con FRB es necesaria para un interruptor de muerte celular inducida por rapamicina. Se transfectaron células 293T con SRa-SeAP (pBP0046), pSH1-FRB_L-VP16 (pBP0731) (4) y pSH1-FKBPv12-Caspasa9 (pBP0044). Después de 24 horas de incubación, se separaron las células y se incubaron con concentraciones crecientes de rapamicina (en azul), C7-isopropiloxirrapamicina (en rojo), rimiducid (en verde) o etanol (el disolvente que contiene las soluciones madre de fármaco). La pérdida de actividad indicadora es una aproximación para la pérdida de viabilidad celular. La actividad indicadora se expresa como un porcentaje de la media de 8 pocillos que no contienen fármaco. Los pocillos que contenían fármaco se ensayaron en pocillos por triplicado.

Se citan las siguientes referencias en este ejemplo:

1. Spencer DM, Wandless TJ, Schreiber SL y Crabtree GR. Controlling signal transduction with synthetic ligands. Science. 1993;262(5136): 1019-24.
2. Acevedo VD, Gangula RD, Freeman KW, Li R, Zhang Y., Wang F, Ayala GE, Peterson LE, Ittmann M y Spencer DM. Inducible FGFR-1 activation leads to irreversible prostate adenocarcinoma and an epithelial-to-mesenchymal transition. Cancer Cell. 2007;12(6):559-71.
3. Spencer DM, Belshaw PJ, Chen L, Ho SN, Randazzo F, Crabtree GR y Schreiber SL. Functional analysis of Fas signaling *in vivo* using synthetic inducers of dimerization. Curr Biol. 1996;6(7):839-47.
4. Bayle JH, Grimley JS, Stankunas K, Gestwicki JE, Wandless TJ y Crabtree GR. Rapamycin analogs with differential binding specificity permit orthogonal control of protein activity. Chem Biol. 2006;13(1):99-107.
5. Strasser A, Cory S y Adams JM. Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. EMBO J. 2011;30(18):3667-83.
6. Fan L, Freeman KW, Khan T, Pham E y Spencer DM. Improved artificial death switches based on caspases and FADD. Hum Gene Ther. 1999;10(14):2273-85.
7. Straathof KC, Pule MA, Yotnda P, Dotti G, Vanin EF, Brenner MK, Heslop HE, Spencer DM y Rooney CM. An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy. Blood. 2005;105(11):4247-54.
8. Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P y Snyder SH. RAFT1: a mammalian protein that binds to

FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. Cell. 1994;78(1):35-43.
9. Brown EJ, Albers MW, Shin TB, Ichikawa K, Keith CT, Lane WS y Schreiber SL. A mammalian protein targeted by GI-arresting rapamycin-receptor complex. Nature. 1994;369(6483):756-8.
10. Chen J, Zheng XF, Brown EJ y Schreiber SL. Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(11):4947-51.
11. Choi J., Chen J, Schreiber SL y Clardy J. Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. Science. 1996;273(5272):239-42.
12. Ho SN, Biggar SR, Spencer DM, Schreiber SL y Crabtree GR. Dimeric ligands define a role for transcriptional activation domains in reinitiation. Nature. 1996;382(6594):822-6.
13. Klemm JD, Beals CR y Crabtree GR. Rapid targeting of nuclear proteins to the cytoplasm. Curr Biol. 1997;7(9):638-44.
14. Stankunas K, Bayle JH, Gestwicki JE, Lin YM, Wandless TJ y Crabtree GR. Conditional protein alleles using knockin mice and a chemical inducer of dimerization. Mol Cell. 2003;12(6):1615-24.
15. Stankunas K, Bayle JH, Havranek JJ, Wandless TJ, Baker D, Crabtree GR y Gestwicki JE. Rescue of Degradation-Prone Mutants of the FK506-Rapamycin Binding (FRB) Protein with Chemical Ligands. Chembiochem. 2007.
16. Liberles SD, Diver ST, Austin DJ y Schreiber SL. Inducible gene expression and protein translocation using nontoxic ligands identified by a mammalian three-hybrid screen. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(15):7825-30.
17. Luengo JI, Yamashita DS, Dunnington D, Beck AK, Rozamus LW, Yen HK, Bossard MJ, Levy MA, Hand A, Newman-Tarr T, et al. Structure-activity studies of rapamycin analogs: evidence that the C-7 methoxy group is part of the effector domain and positioned at the FKBP12-FRAP interface. Chem Biol. 1995;2(7):471-81.

pBP0463--pSH1-FRB$_L$.dCaspasa9..T2A (de la Figura 41)

Fragmento	**Nucleótido**	**Péptido**
Enlazador	*ATGCTCGAG*	*MLE*
FRB$_I$	*TGGCATGAAGGGTTGGAAGAAGCTTCAAGGCTGT*	*GVQVETISPGDGRTFPK*
	ACTTCGGAGAGAGGAACGTGAAGGGCATGTTTGA	*RGQTCVVHYTGMLEDG*
	GGTTCTTGAACCTCTGCACGCCATGATGGAACGG	*KKFDSSRDRNKPFKFML*
	GGACCGCAGACACTGAAAGAAACCTCTTTTAATC	*GKQEVIRGWEEGVAQM*
	AGGCCTACGGCAGAGACCTGATGGAGGCCCAAG	*SVGQRAKLTISPDYAYG*
	AATGGTGTAGAAAGTATATGAAATCCGGTAACGT	*ATGHPPKIPPHATLVFDV*
	GAAAGACCTGCTCCAGGCCTGGGACCTTTATTAC	*ELLKLE*
	CATGTGTTCAGGCGGATCAGTAAG	
Enlazador	*TCAGGCGGTGGCTCAGGTGTCGAG*	*SGGGSGVD*
Δ-Caspasa9	*GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGA*	*DGFGDVGALESLRGNA*
	GTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTTACATCCT	*DLAYILSMEPCGHCLIIN*
	GAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATC	*NVNFCRESGLRTRTGSN*
	AACAATGTGAACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCC	*IDCEKLRRRFSSLHFMV*
	GCACCCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAA	*EVKGDLTAKKMVLALLE*
	GTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTCATG	*LARQDHGALDCCVVVIL*
	GTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAA	*SHGCQASHLQFPGAVY*

(continuación)

Fragmento	Nucleótido	Péptido
	ATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCgGCAG	GTDGCPVSVEKIVNIFNG
	GACCACGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTC	TSCPSLGGKPKLFFIQAC
	ATTCTCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGC	GGEQKDHGFEVASTSP
	AGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGAT	EDESPGSNPEPDATPFQ
	GCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTT	EGLRTFDQLDAISSLPTP
	CAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGAA	SDIFVSYSTFPGFVSWR
	GCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGG	DPKSGSWYVETLDDIFE
	GAGCAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCTCC	QWAHSEDLQSLLLRVAN
	ACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACC	AVSVKGIYKQMPGCFNF
	CCGAGCCAGATGCCACCCCGTTCCAGGAAGGTT	LRKKLFFKTSASRA
	TGAGGACCTTCGACCAGCTGGACGCCATATCTAG	
	TTTGCCCACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACT	
	CTACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCC	
	CAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA	
	CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAGAC	
	CTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTG	
	TTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGG	
	TTGCTTTAATTTCCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAA	
	AACATCAGCTAGCAGAGCC	
T2A	GAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGGGAC	EGRGSLLTCGDVEENP
	GTGGAGGAAAATCCCGGGCCCtga	GP

pBP0044--pSH1-FKBP$_{V36}$.dCaspasa9.T2A (de la Figura 42)

Fragmento	***Nucleótido***	***Péptido***
Enlazador	ATGCTCGAG	MLE
FKBP$_{V36}$	GGAGTGCAGGTGGAgACtATCTCCCCAGGAGACG	GVQVETISPGDGRTFPK
	GGCGCACCTTCCCCAAGCGCGGCCAGACCTGCG	RGQTCVVHYTGMLEDG
	TGGTGCACTACACCGGGATGCTTGAAGATGGAAA	KKVDSSRDRNKPFKFML
	GAAAGTTGATTCCTCCCGGGACAGAAACAAGCCC	GKQEVIRGWEEGVAQM
	TTTAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCC	SVGQRAKLTISPDYAYG
	GAGGCTGGGAAGAAGGGGTTGCCCAGATGAGTG	ATGHPGIIPPHATLVFDV
	TGGGTCAGAGAGCCAAACTGACTATATCTCCAGA	ELLKL
	TTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCATC	
	ATCCCACCACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGG	
	AGCTTCTAAAACTGGAA	
Enlazador	TCAGGCGGTGGCTCAGGTGTCGAG	SGGGSGVD
Δ-Caspasa9	GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGA	DGFGDVGALESLRGNA
	GTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTTACATCCT	DLAYILSMEPCGHCLIIN
	GAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATC	NVNFCRESGLRTRTGSN
	AACAATGTGAACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCC	IDCEKLRRRFSSLHFMV
	GCACCCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAA	EVKGDLTAKKMVLALLE
	GTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTCATG	LARQDHGALDCCVVVIL
	GTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAA	SHGCQASHLQFPGAVY
	ATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCgGCAG	GTDGCPVSVEKIVNIFNG
	GACCACGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTC	TSCPSLGGKPKLFFIQAC
	ATTCTCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGC	GGEQKDHGFEVASTSP
	AGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGAT	EDESPGSNPEPDATPFQ
	GCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTT	EGLRTFDQLDAISSLPTP
	CAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGAA	SDIFVSYSTFPGFVSWR
	GCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGG	DPKSGSWYVETLDDIFE
	GAGCAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCTCC	QWAHSEDLQSLLLRVAN
	ACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACC	AVSVKGIYKQMPGCFNF
	CCGAGCCAGATGCCACCCCGTTCCAGGAAGGTT	LRKKLFFKTSASRA
	TGAGGACCTTCGACCAGCTGGACGCCATATCTAG	
	TTTGCCCACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACT	
	CTACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCC	
	CAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA	
	CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAGAC	
	CTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTG	
	TTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGG	
	TTGCTTTAATTTCCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAA	
	AACATCAGCTAGCAGAGCC	

(continuación)

Fragmento	*Nucleótido*	*Péptido*
T2A	*GAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGGGAC*	*EGRGSLLTCGDVEENP*
	GTGGAGGAAAATCCCGGGCCCtga	*GP*

Materiales y métodos

Puede consultarse el siguiente conjunto de materiales y métodos para preparar o ensayar ciertas realizaciones de la presente solicitud.

Producción de retrovirus y transducción de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

Se siembran células HEK 293T (1,5 x 10^5) en una placa de cultivo tisular de 100 mm en 10 ml de DMEM4500, complementado con glutamina, penicilina/estreptomicina y suero fetal de ternero al 10 %. Después de 16-30 horas de incubación, se transfectan las células usando el protocolo de GeneJuice® de Novagen. En resumen, para cada transfección, se pipetean 0,5 ml de OptiMEM (LifeTechnologies) en un tubo de microcentrifugadora de 1,5 ml y se añaden 30 µl de reactivo GeneJuice seguido de agitación vorticial durante 5 s. Se dejan reposar las muestras 5 minutos para reposar la suspensión de GeneJuice. Se añade ADN (15 µg en total) a cada tubo y se mezcla pipeteando hacia arriba y hacia abajo cuatro veces. Se dejan reposar las muestras durante 5 minutos para la formación de complejos de GeneJuice-ADN y se añade la suspensión gota a gota a una placa de células 293T. Una transfección típica incluyó estos plásmidos para producir retrovirus incompetentes para replicación: 3,75 µg de plásmido que contiene gag-pol (pEQ-PAM3(-E)), 2,5 µg de plásmido que contiene la envuelta vírica (por ejemplo, RD114), Retrovirus que contiene el gen de interés = 3 = 3,75 µg.

Las PBMC se estimulan con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 recubiertos previamente sobre pocillos de placas de cultivo tisular. 24 horas después de la siembra, se añaden al cultivo 100 U/ml de IL-2. En el día 2 o tres, se filtra el sobrenadante que contiene retrovirus de células 293T transfectadas a 0,45 µm y se centrifugan en placas no tratadas para CT recubiertas previamente con Retronectin (10 µl por pocillo en 1 ml de PBS por 1 cm^2 de superficie). Las placas se centrifugan a 2000 g durante 2 horas a temperatura ambiente. Los blastos CD3/CD28 se resuspenden en 2,5x10^5 células/ml en medio completo, complementado con 100 U/ml de IL-2 y se centrifugaron en la placa a 1000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de 3-4 días de incubación, se cuentan las células y se mide la eficacia de la transducción mediante citometría de flujo usando los anticuerpos marcadores adecuados (normalmente CD34 o CD19). Las células se mantienen en medio completo complementado con 100 U/ml de IL-2, se vuelven a alimentar las células cada 2-3 días con medio fresco e IL-2 y se separan según se necesite para expandir las células.

Ensayo de caspasa de linfocitos T en células cultivadas

Después de la transducción con el retrovirus adecuado, se siembran 50.000 T por pocillo de placas de 96 pocillos en presencia o ausencia de fármacos de suicidio (rimiducid o rapamicina) en medio para CTL sin IL-2. Para posibilitar la detección de la apoptosis usando el instrumento IncuCyte, se añaden a cada pocillo 2 µM de reactivo para de apoptosis de Caspasa-3/7 IncuCyte™ Kinetic (Essen Bioscience, 4440) hasta alcanzar un volumen total de 200 ul. Las placas se centrifugan durante 5 min a 400 x g y se colocan en el interior del IncuCyte (Dual Color, modelo 4459) para monitorizar la fluorescencia verde cada 2-3 horas durante un total de 48 horas a un objetivo de 10x. El análisis de imágenes se lleva a cabo usando la definición de procesado "Tcells_caspreagent_phase_green_10x_MLD". Se usa la métrica de "Total Green Object Integrated Intensity" para cuantificar la activación de caspasa. Cada condición se lleva a cabo en duplicados y se obtienen imágenes de cada pocillo en 4 ubicaciones diferentes.

Ensayo antitumoral de linfocitos T

Se marcaron establemente células tumorales HPAC PSCA$^+$ con proteína RFP localizada en el núcleo usando el reactivo NucLight™ Red Lentivirus (Essen Bioscience, 4625). Para establecer el cocultivo, se sembraron 4000 células HPAC-RFP por pocillo de placas de 96 pocillos en 100 ul de medio para CTL son IL-2 durante al menos 4 horas para permitir la adherencia de las células tumorales. Después de la transducción con el retrovirus adecuado y de dejarlas reposar durante al menos 7 días en cultivo, se siembran T de acuerdo con diversas relaciones de E:T en las placas de 96 pocillos que contienen HPAC-RFP. También se añade Rimiducid al cultivo hasta alcanzar un volumen total por pocillo de 300 ul. Cada placa se configura en duplicados, una placa para monitorizar con el IncuCyte y una placa para recoger sobrenadantes para el ensayo ELISA en el día 2. Las placas se centrifugaron durante 5 min a 400 x g y se colocaron dentro del IncuCyte (Dual Color, modelo 4459) para monitorizar la fluorescencia roja (y la fluorescencia verde en caso de que se marcasen los linfocitos T con GFP-Ffluc) cada 2-3 horas durante un total de 7 días a un objetivo de 10x. El análisis de imágenes se lleva a cabo usando la definición de procesado "HPAC-RFP_TcellsGFP_10x_MLD". En el día 7, se analizan las células HPAC-RFP usando la métrica "Red Object Count (1/well)". También en el día 7, se añade fármaco de suicidio 0 o 10 nM a cada pocillo del cocultivo y se vuelve a colocar en el IncuCyte para monitorizar la eliminación de linfocitos T. En el día 8, se analizan

los linfocitos T-GFP usando la métrica "Total Green Object Integrated Intensity". Cada condición se lleva a cabo al menos en duplicados y se obtienen imágenes de cada pocillo en 4 ubicaciones diferentes.

Para medir la actividad antitumoral en células Raji, se determinan poblaciones de células mediante citometría de flujo en lugar del IncuCyte ya que las células no se adhieren a una placa. Las células Raji (ATCC) marcadas mediante expresión estable de proteína fluorescente verde (Raji-GFP) son una línea de células de linfoma de Burkitt que expresan CD19 en la superficie celular y son una diana para un CAR anti-CD19. Se sembraron 50000 células Raji-GFP en una placa de 24 pocillos con 10000 linfocitos CAR-T, a una relación E:T de 1:5. El sobrenadante de medio se recoge a las 48 horas para la determinación de la liberación de citoquinas por linfocitos CAR-T activados. El grado de eliminación tumoral se determina a los 7 días y 14 días mediante citometría de flujo (Galeos, Beckman Coulter) por la proporción de células tumorales marcadas con GFP y linfocitos T marcados con CD3.

Obtención de imágenes IVIS

Se anestesió con isoflurano a ratones NSG con linfocitos T marcados y se les inyectaron 100 µl de D-luciferina (15 mg/ml de solución madre en PBS) por vía intraperitoneal (i.p.) en el abdomen inferior. Después de 10 minutos, se transfirieron los animales de la cámara de anestesia a la plataforma IVIS. Se adquirieron imágenes de los lados dorsales y ventrales con un dispositivo de obtención de imágenes IVIS (Perkin Elmer) y se cuantificó BLI y se documentó con el programa informático Living Image (IVIS Imaging Systems).

Western blot

Después de la transducción con el retrovirus adecuado, se sembraron 6.000.000 linfocitos T por pocillo de placas de 6 pocillos en 3 ml de medio de CTL. Veinticuatro horas después, se recogieron las células, se lavaron en PBS frío y se lisaron en tampón de lisis y extracción RIPA (Thermo, 89901) que contenía cóctel inhibidor de proteasas Halt 1x (Thermo, 87786) sobre hielo durante 30 min en las sembradas. Los lisados se centrifugaron a 16.000 x g durante 20 min a 4 °C y se transfirieron los sobrenadantes a nuevos tubos Eppendorf. El ensayo de proteínas se lleva a cabo usando el kit de ensayo de proteína Pierce BCA (Thermo, 23227) según las recomendaciones del fabricante. Para preparar las muestras para la SDS-PAGE, se mezclaron 50 ug de lisados con tampón de muestra de Laemmli 4x (Bio Rad, 1610747) y calor a 95 °C durante 10 min. Paralelamente, se prepararon geles de SDS al 10 % usando el aparato de moldeado de Bio Rad y solución de Acrilamida/bis al 30 % (Bio Rad, 160158). Las muestras se cargaron junto con los patrones del Precision Plus Protein Dual Color (Bio Rad, 1610374) y se ejecutaron en tampón de ejecución de Tris/glicina 1x (Bio Rad, 1610771) a 140 V durante 90 min. Después de la separación de proteínas, se transfirieron los geles a membranas de PVDF usando el programa 0 (7 min en total) en el dispositivo iBlot 2 (Thermo, IB21001). Las membranas se sondaron con anticuerpos primario y secundario usando el dispositivo iBind Flex Western (Thermo, SLF2000) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se usa anticuerpo anti-MyD88 (Sigma, SAB1406154) a una dilución 1:200 y se usa el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Thermo, A16072) a una dilución 1:500. Se usa anticuerpo para caspasa-9 (Thermo, PA1-12506) a una dilución 1:200 y se usa el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo conjugado con HRP (Thermo, A16104) a una dilución 1:500. Se usa anticuerpo para β-actina (Thermo, PA1-16889) a una dilución 1:1000 y el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo conjugado a HRP (Thermo, A16104) a una dilución 1:1000. Las membranas se revelaron usando el kit de sustrato de máxima sensibilidad SuperSignal West Femto (Thermo, 34096) y se obtuvieron imágenes usando la cámara GelLogic 6000 Pro y el programa informático CareStream MI (v.5.3.1.16369).

Transfección de células para ensayo indicador

Se siembran células HEK 293T (1,5 x 10^5) en una placa de cultivo tisular de 100 mm en 10 ml de DMEM4500, complementado con glutamina, penicilina/estreptomicina y suero fetal de ternero al 10 %. Después de 16-30 horas de incubación, se transfectan las células usando el protocolo de GeneJuice® de Novagen. En resumen, para cada transfección, se pipetean 0,5 ml de OptiMEM en un tubo de microcentrifugadora de 1,5 ml y se añadieron 15 µl de reactivo GeneJuice seguido de agitación vorticial durante 5 s. Se dejan reposar las muestras 5 minutos para reposar la suspensión de GeneJuice. Se añade ADN (5 µg en total) a cada tubo y se mezcla pipeteando hacia arriba y hacia abajo cuatro veces. Se dejan reposar las muestras durante 5 minutos para la formación de complejos de GeneJuice-ADN y se añade la suspensión gota a gota a una placa de células 293T. Una transfección típica contiene 1 µg de NFkB-SEAP (5), 4 µg de Go-CAR (pBP0774) o 4 µg de MC-Rap-CAR (pBP1440) (1).

Estimulación de células con fármacos dimerizadores

24 horas después de la transfección (4.1), se separan las células 293T en placas de 96 pocillos y se incuban con diluciones de fármacos de dimerización. En resumen, se añaden 100 µl de medio a cada pocillo de una placa de fondo plano de 96 pocillos. Los fármacos se diluyen en tubos a una concentración 4X de la concentración máxima en el gradiente para colocarlos en la placa. Se añaden 100 µl de ligando de dimerización (rimiducid, rapamicina, isopropoxilrapamicina) a cada uno de los tres pocillos en el extremo derecho de la placa (los ensayos se llevan a cabo, por tanto, por triplicado). Después, se transfieren 100 µl de cada pocillo que contenía fármaco al pocillo adyacente y se repite el ciclo 10 veces para producir un gradiente en etapas seriado de dos veces. Los últimos pocillos se dejan sin tratar y sirven como control para la actividad indicadora basal. Después, se tripsinizan las

células 293 transfectadas, se lavan con medio completo, se suspendieron en medio y se separó en alícuotas de 100 µl en cada pocillo que contenía fármaco (o sin fármaco). Las células se incuban 24 horas.

Ensayo de actividad indicadora

El promotor SRα es un elemento transcripcional híbrido que comprende la región temprana de SV40 (que impulsa la transcripción de antígeno T) y partes (R y U5) de la repetición terminal larga (LTR) del virus linfotrófico de linfocitos T humanos (HTLV-1). Este promotor impulsa altos niveles constitutivos del gen indicador de fosfatasa alcalina secretado (SeAP). La activación de Caspasa-9 mediante dimerización da lugar rápidamente a muerte celular y aumenta la proporción de células que mueren a medida que aumentan las cantidades de fármaco. Cuando mueren las células, se detiene la transcripción y la traducción del indicador pero las proteínas indicadoras ya secretadas persisten en el medio. La pérdida de actividad de SeAP constitutiva es por tanto una aproximación eficaz para la activación dependiente de fármacos de la muerte celular.

24 horas después de la estimulación con fármaco, se envuelven las placas de 96 pocillos para impedir la evaporación y se incubaron a 65 °C durante 2 horas para inactivar las fosfatasas endógenas y séricas, mientras que permanece el indicador de SeAP termoestable (3, 12, 14). Se cargan muestras de 100 µl de cada pocillo en pocillos individuales de una placa de ensayo de 96 pocillos con paredes negras. Las muestras se incuban con fosfato de 4-metilumbeliferilo (4-MUP) 0,5 mM en dietanolamina 0,5 M a pH 10,0 durante 4 a 16 horas. La actividad de fosfatasa se mide por fluorescencia con excitación a 355 nm y emisión a 460 nm. Los datos se transfieren a una hoja de cálculo de Microsoft Excel para la tabulación y se representan gráficamente con GraphPad Prism.

Producción de isopropiloxirrapamicina

Se emplea el método de Luengo et al. ((J. Org. Chem 59:6512, (1994)), (17, 18)). En resumen, se disuelven 20 mg de rapamicina en 3 ml de isopropanol y se añaden 22,1 mg de ácido p-tolueno sulfónico y se incuba a temperatura ambiente con agitación durante 4-12 horas. Al completarse, se añaden 5 ml de acetato de etilo y se extraen los productos cinco veces con bicarbonato de sodio saturado y 3 veces con salmuera (cloruro de sodio saturado). La fase orgánica se seca y se vuelve a disolver en acetato de etilo:hexano (3:1). Los estereoisómeros y productos menores se resuelven mediante cromatografía ultrarrápida en una columna de gel de sílice de 10 a 15 ml con 3:1 de acetato de etilo: hexano a una presión de 3-4 kPa y se secan las fracciones. Las fracciones se ensayan mediante espectrofotometría a 237 nM, 267 nM, 278 nM y 290 nM y se ensayó su especificidad de unión en un interruptor transcripcional específico para alelo FRB.

Los términos "un" o "una" pueden referirse a uno de una pluralidad de elementos a los que modifica (por ejemplo, "un reactivo" puede significar uno o más reactivos) a menos que quede claro por el contexto que se describe uno de los elementos o más de uno de los elementos. El término "aproximadamente", como se usa en el presente documento, se refiere a un valor a un 10 % del parámetro subyacente (es decir, más o menos un 10 %) y el uso del término "aproximadamente" al comienzo de una serie de valores modifica a cada uno de los valores (es decir, "aproximadamente 1, 2 y 3" se refiere a aproximadamente 1, aproximadamente 2 y aproximadamente 3). Por ejemplo, un peso de "aproximadamente 100 gramos" puede incluir pesos de entre 90 gramos y 110 gramos. Además, cuando se describe una lista de valores en el presente documento (por ejemplo, aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 % u 86 %), el lisado incluye todos los valores intermedios y fraccionales de los mismos (por ejemplo, 54 %, 85,4 %).

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico que comprende un promotor, unido operativamente a

a) un primer polinucleótido que codifica un primer polipéptido quimérico, en donde el primer polipéptido quimérico comprende (i) una primera región de multimerización o una segunda región de multimerización; y (ii) una región de polipéptido MyD88 o una región de polipéptido MyD88 truncada que carece del dominio TIR; y
b) un segundo polinucleótido que codifica un segundo polipéptido quimérico, en donde el segundo polipéptido quimérico comprende (i) una región de polipéptido proapoptótico y (ii) la primera región de multimerización o la segunda región de multimerización, en donde
la segunda región de multimerización tiene una secuencia de aminoácidos diferente a la primera región de multimerización; el primer polipéptido quimérico comprende la primera región de multimerización y el segundo polipéptido quimérico comprende la segunda región de multimerización o el primer polipéptido quimérico comprende la segunda región de multimerización y el segundo polipéptido quimérico comprende la primera región de multimerización;
la primera región de multimerización y la segunda región de multimerización se unen a un primer ligando; la primera región de multimerización se une a un segundo ligando; y
el segundo ligando no se une significativamente a la segunda región de multimerización.

2. Una célula modificada, transfectada o transducida con el ácido nucleico de la reivindicación 1.

3. Una célula modificada que comprende

a) un primer polinucleótido que codifica un primer polipéptido quimérico, en donde el primer polipéptido quimérico comprende (i) una primera región de multimerización o una segunda región de multimerización; y (ii) una región de polipéptido MyD88 o una región de polipéptido MyD88 truncada que carece del dominio TIR; y
b) un segundo polinucleótido que codifica un segundo polipéptido quimérico, en donde el segundo polipéptido quimérico comprende (i) una región de polipéptido proapoptótico y (ii) la primera región de multimerización o la segunda región de multimerización, en donde
la segunda región de multimerización tiene una secuencia de aminoácidos diferente a la primera región de multimerización; el primer polipéptido quimérico comprende la primera región de multimerización y el segundo polipéptido quimérico comprende la segunda región de multimerización o el primer polipéptido quimérico comprende la segunda región de multimerización y el segundo polipéptido quimérico comprende la primera región de multimerización;
la primera región de multimerización y la segunda región de multimerización se unen a un primer ligando; la primera región de multimerización se une a un segundo ligando; y
el segundo ligando no se une significativamente a la segunda región de multimerización.

4. El ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones anteriores o la célula modificada de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el primer polipéptido quimérico comprende además una región de polipéptido citoplasmático de CD40 que carece del dominio extracelular de CD40.

5. El ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones anteriores o la célula modificada de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ácido nucleico o la célula modificada comprende además un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico, un receptor de linfocitos T o un receptor de antígeno quimérico a base de receptor de linfocitos T.

6. El ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones anteriores o la célula modificada de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la primera región de multimerización es una región variante de FKBP12 y la segunda región de multimerización es una región de unión a rapamicina de FKBP12 (FRB) o variante de FRB.

7. El ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones anteriores o la célula modificada de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el primer ligando es rapamicina o un rapálogo y el segundo ligando se selecciona entre el grupo que consiste en AP1903, AP20187 y AP1510.

8. El ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones anteriores o la célula modificada de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la región variante de FKBP12 tiene una sustitución de aminoácidos en la posición 36 seleccionada entre el grupo que consiste en valina, leucina, isoleucina y alanina.

9. El ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones anteriores o la célula modificada de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el primer polipéptido quimérico comprende la primera región de multimerización;
la primera región de multimerización comprende dos regiones variantes de FKBP12;
el segundo polipéptido quimérico comprende la segunda región de multimerización; y
la segunda región de multimerización comprende una región FRB o una región variante de FRB.

10. El ácido nucleico o la célula modificada de la reivindicación 9, en donde
el primer polipéptido quimérico comprende dos regiones FKBP12v36 y una región de polipéptido MyD88 truncada que carece del dominio TIR; y
el segundo polipéptido quimérico comprende una región de Caspasa-9 y una región FRB o una región variante de FRB.

11. El ácido nucleico o la célula modificada de la reivindicación 10, en donde el primer polipéptido quimérico comprende una región de polipéptido citoplasmático de CD40 que carece del dominio extracelular de CD40.

12. El ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones anteriores o la célula modificada de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde
el primer polipéptido quimérico comprende (i) dos regiones FKBP12v36; (ii) una región de polipéptido MyD88 truncada que carece del dominio TIR; y (iii) una región de polipéptido citoplasmático CD40 que carece del dominio extracelular de CD40; el segundo polipéptido quimérico comprende una región de Caspasa-9 y una región FRB o una región FRB_L; y
el ácido nucleico o la célula modificada comprende un tercer polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende una región transmembrana, una molécula de activación de linfocitos T y un motivo de reconocimiento de antígeno, en donde el motivo de reconocimiento de antígeno se une a un antígeno seleccionado entre el grupo que consiste en CD19, PSCA, Her2/Neu, el PSMA, Muc1, ROR1, Mesotelina, GD2, CD123, Muc16, CD33, CD38 y CD44v6.

13. El ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4 a 8 o la célula modificada de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en donde
el primer polipéptido quimérico comprende una región FRB o una región variante de FRB y una región de polipéptido MyD88 truncado que carece del dominio TIR; y el segundo polipéptido quimérico comprende una región FKBP12v36 y una región de polipéptido de Caspasa-9.

14. El ácido nucleico o la célula modificada de la reivindicación 13, en donde el primer polipéptido quimérico comprende una región de polipéptido citoplasmático de CD40 que carece del dominio extracelular de CD40.

15. El ácido nucleico o la célula modificada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o 13 a 14, en donde
el primer polipéptido quimérico comprende (i) una región FRB o FRB variante; (ii) una región de polipéptido MyD88 truncada que carece del dominio TIR; y (iii) una región de polipéptido citoplasmático CD40 que carece del dominio extracelular de CD40; el segundo polipéptido quimérico comprende una región de Caspasa-9 y una región FKBP12v36;
el ácido nucleico o la célula modificada comprende un tercer polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende una región transmembrana, una molécula de activación de linfocitos T y un motivo de reconocimiento de antígeno seleccionado entre el grupo que consiste en PSMA, PSCA, Muc1, CD19, ROR1, Mesotelina, GD2, CD123, Muc16, CD33, CD38, CD44v6 y Her2/Neu; y
la región variante FRB es una región FRB_L.

16. El ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones anteriores o la célula modificada de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el segundo polinucleótido codifica un polipéptido de Caspasa-9 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 300; o
el segundo polinucleótido codifica un polipéptido de Caspasa-9 que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 300.

17. El ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones anteriores o la célula modificada de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el primer polinucleótido codifica un polipéptido MyD88 truncado que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 252; o
el primer polinucleótido codifica un polipéptido MyD88 que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 252.

18. El ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones anteriores o la célula modificada de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ácido nucleico o la célula modificada comprende una región variante de FRB y
la región variante de FRB es una región FRB_L que tiene la secuencia de aminoácidos de FRBI proporcionada en la tabla 7; o
la región variante de FRB es una región FRB_L que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad respecto de la secuencia de aminoácidos de FRBI proporcionada en la tabla 7.

19. El ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones anteriores o la célula modificada de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ácido nucleico o la célula modificada comprende una región variante de FKBP12 y
la región variante de FKBP12 es una región FKBP12v36 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21; o la región variante de FKBP12 es una región FKBP12v36 que tiene al menos un 95 % de identidad respecto de

la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21.

20. La célula modificada de cualquier reivindicación anterior, en donde la célula es un linfocito T, linfocito infiltrante en tumores, linfocito NK-T o célula NK.

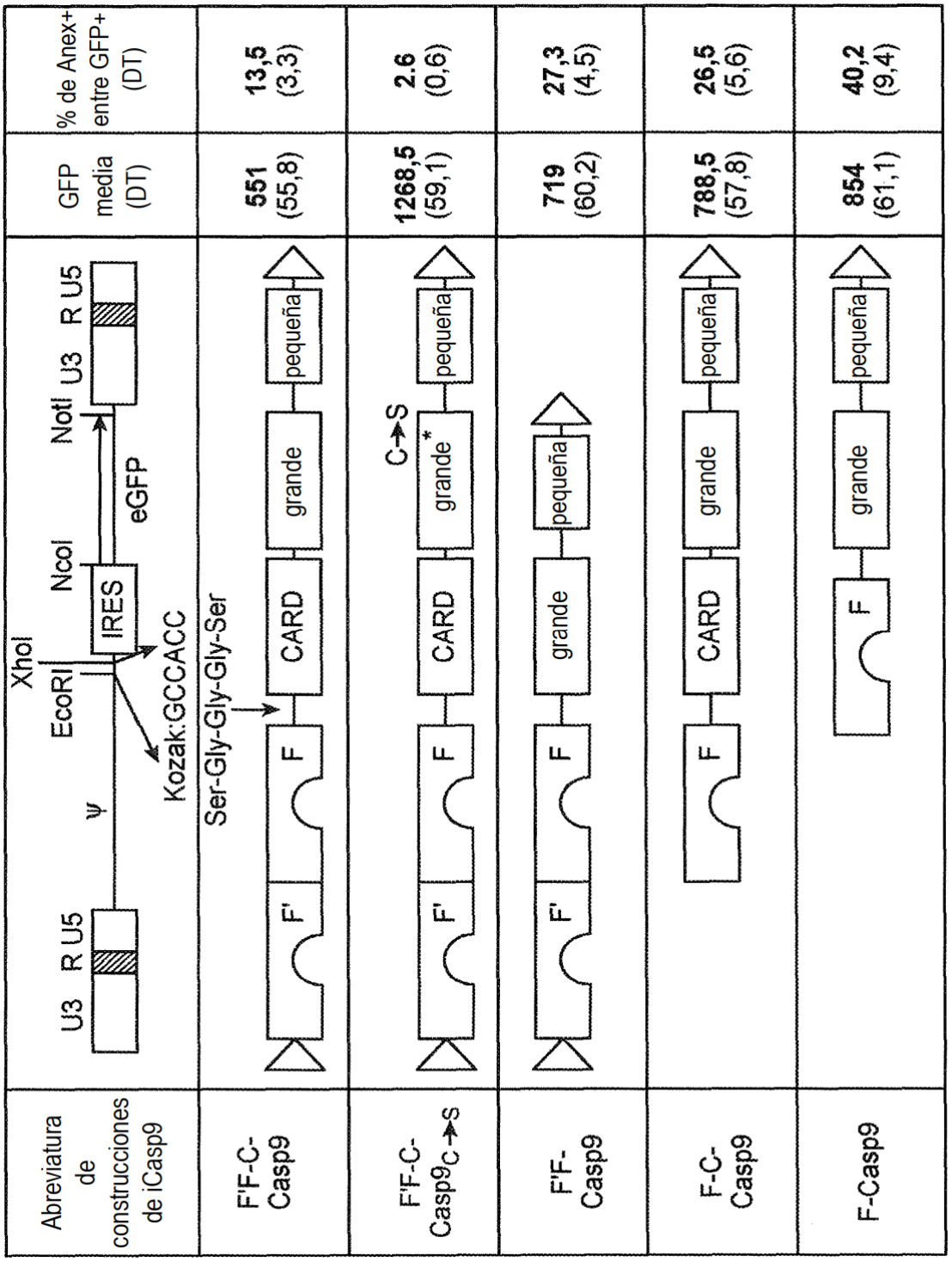

Abreviatura de construcciones de iCasp9
U3 R U5
ψ
XhoI
EcoRI
NcoI
IRES
eGFP
NotI
U3 R U5
Kozak:GCCACC
Ser-Gly-Gly-Gly-Ser
F'F-C-Casp9
F'F-C-Casp9C→S
F'F-Casp9
F-C-Casp9
F-Casp9
F'
F
CARD
grande
pequeña
C→S
grande*
GFP media (DT)
551 (55,8)
1268,5 (59,1)
719 (60,2)
788,5 (57,8)
854 (61,1)
% de Anex+ entre GFP+ (DT)
13,5 (3,3)
2.6 (0,6)
27,3 (4,5)
26,5 (5,6)
40,2 (9,4)

FIG. 1A

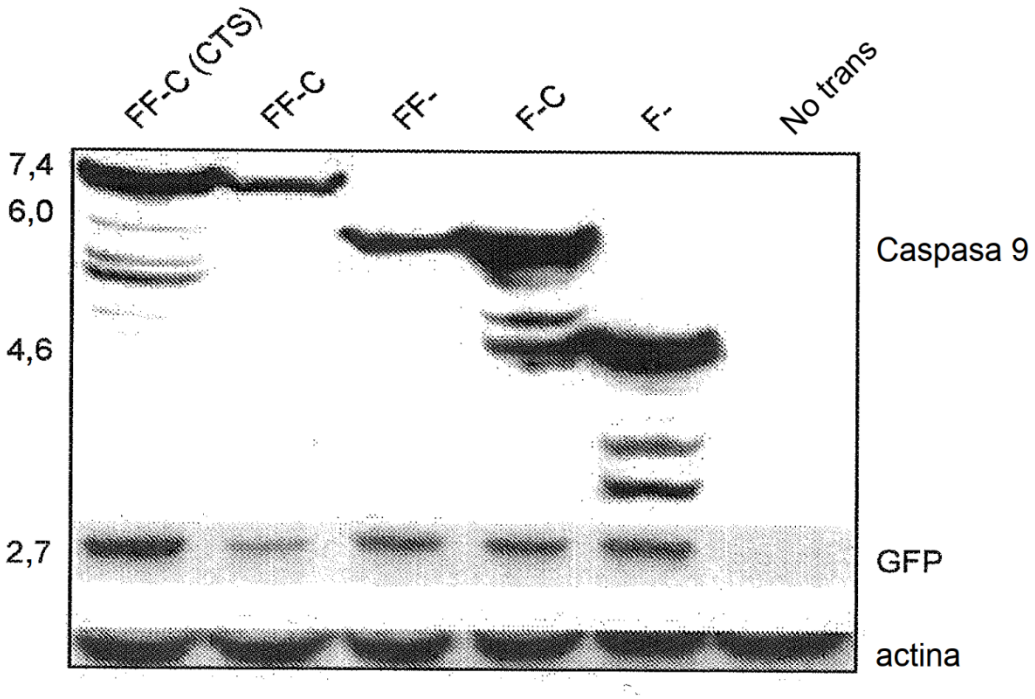


FIG. 1B

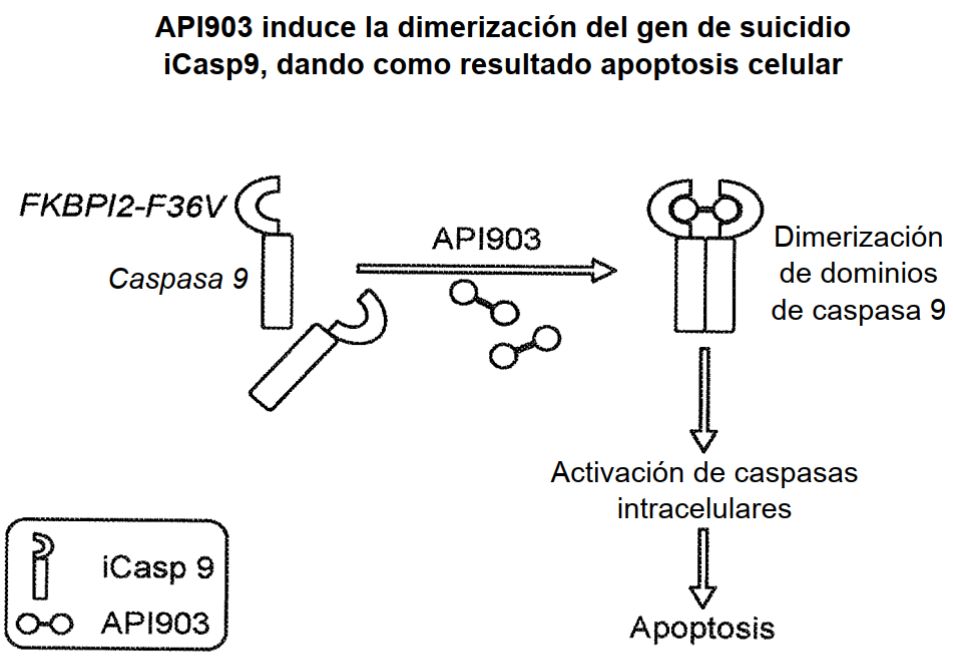

API903 induce la dimerización del gen de suicidio iCasp9, dando como resultado apoptosis celular
FKBPI2-F36V
Caspasa 9
API903
Dimerización de dominios de caspasa 9
Activación de caspasas intracelulares
Apoptosis
iCasp 9
API903

FIG. 2

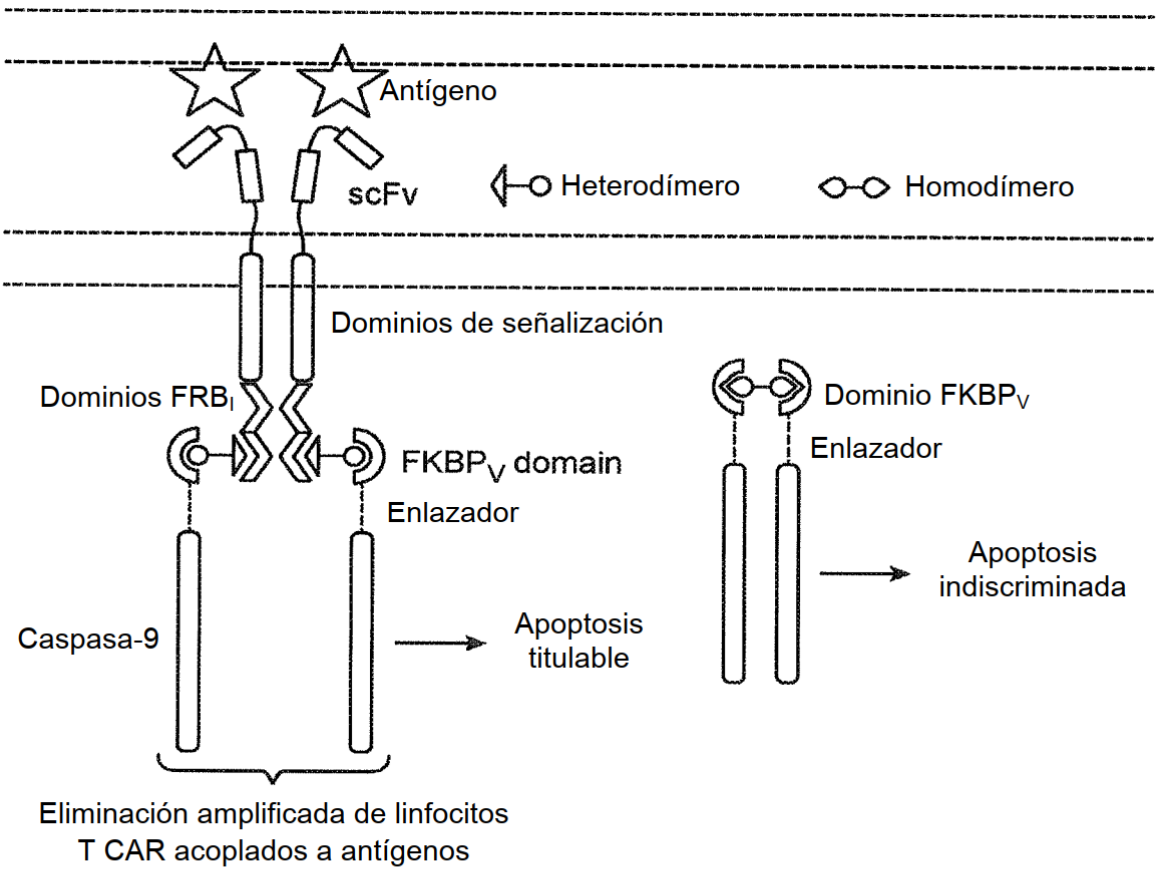

Antígeno
scFv
Heterodímero
Homodímero
Dominios de señalización
Dominios FRB$_l$
FKBP$_V$ domain
Enlazador
Caspasa-9
Apoptosis titulable
Dominio FKBP$_V$
Enlazador
Apoptosis indiscriminada
Eliminación amplificada de linfocitos T CAR acoplados a antígenos

FIG. 3

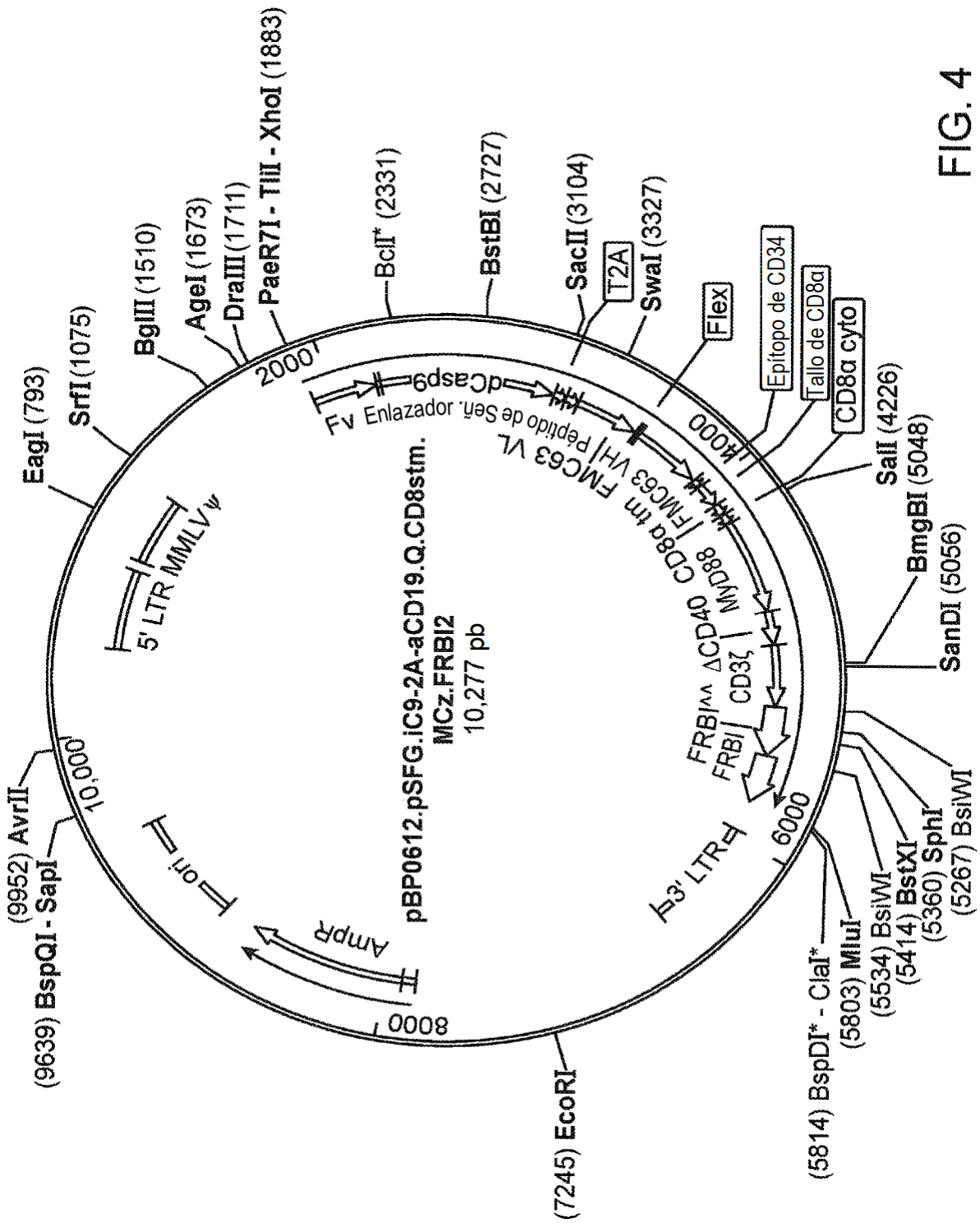

pBP0612.pSFG.iC9-2A-aCD19.Q.CD8stm.
MCz.FRBI2
10,277 pb
5' LTR MMLV
Fv Enlazador Péptido de Señ. dCasp9
FMC63 VL
FMC63 VH
CD8a tm
CD40
MyD88
CD3ζ
FRBI
FRBI
3' LTR
Ampr
ori
Flex
Epitopo de CD34
Tallo de CD8a
CD8a cyto
T2A
2000
4000
6000
8000
10,000
(9952) AvrII
(9639) BspQI - SapI
(7245) EcoRI
(5814) BspDI* - ClaI*
(5803) MluI
(5534) BsiWI
(5414) BstXI
(5360) SphI
(5267) BsiWI
SanDI (5056)
BmgBI (5048)
SalI (4226)
EagI (793)
SrfI (1075)
BglII (1510)
AgeI (1673)
DraIII (1711)
PaeR7I - TliI - XhoI (1883)
BclI* (2331)
BstBI (2727)
SacII (3104)

FIG. 4

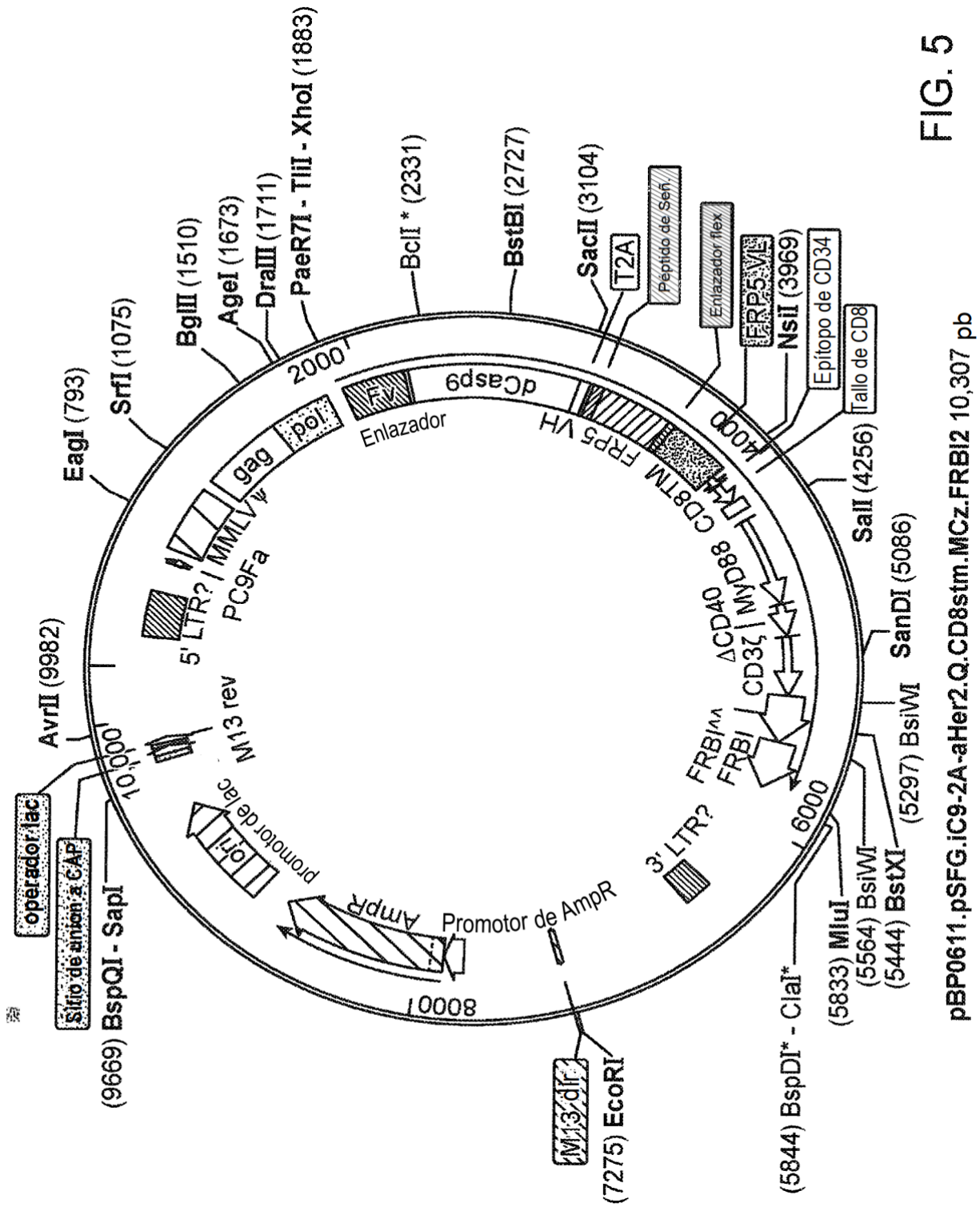

pBP0611.pSFG.iC9-2A-aHer2.Q.CD8stm.MCz.FRBI2 10,307 pb
2000
4000
6000
8000
10,000
dCasp9
Enlazador
FRP5 VH
CD8TM
ΔCD40
MyD88
CD3ζ
FRBI
FRBI
3' LTR?
Promotor de AmpR
AmpR
ori
Promotor de lac
M13 rev
5' LTR? / MMLV ψ
PC9Fa
gag
pol
Péptido de Señ.
Enlazador flex
FRP5 VL
Epítopo de CD34
Tallo de CD8
T2A
operador lac
Sitio de unión a CAP
M13 dir
(9669) BspQI - SapI
AvrII (9982)
EagI (793)
SrfI (1075)
BglII (1510)
AgeI (1673)
DraIII (1711)
PaeR7I - TliI - XhoI (1883)
BclI * (2331)
BstBI (2727)
SacII (3104)
(7275) EcoRI
(5844) BspDI* - ClaI*
(5833) MluI
(5564) BsiWI
(5444) BstXI
(5297) BsiWI
SanDI (5086)
SalI (4256)

FIG. 5

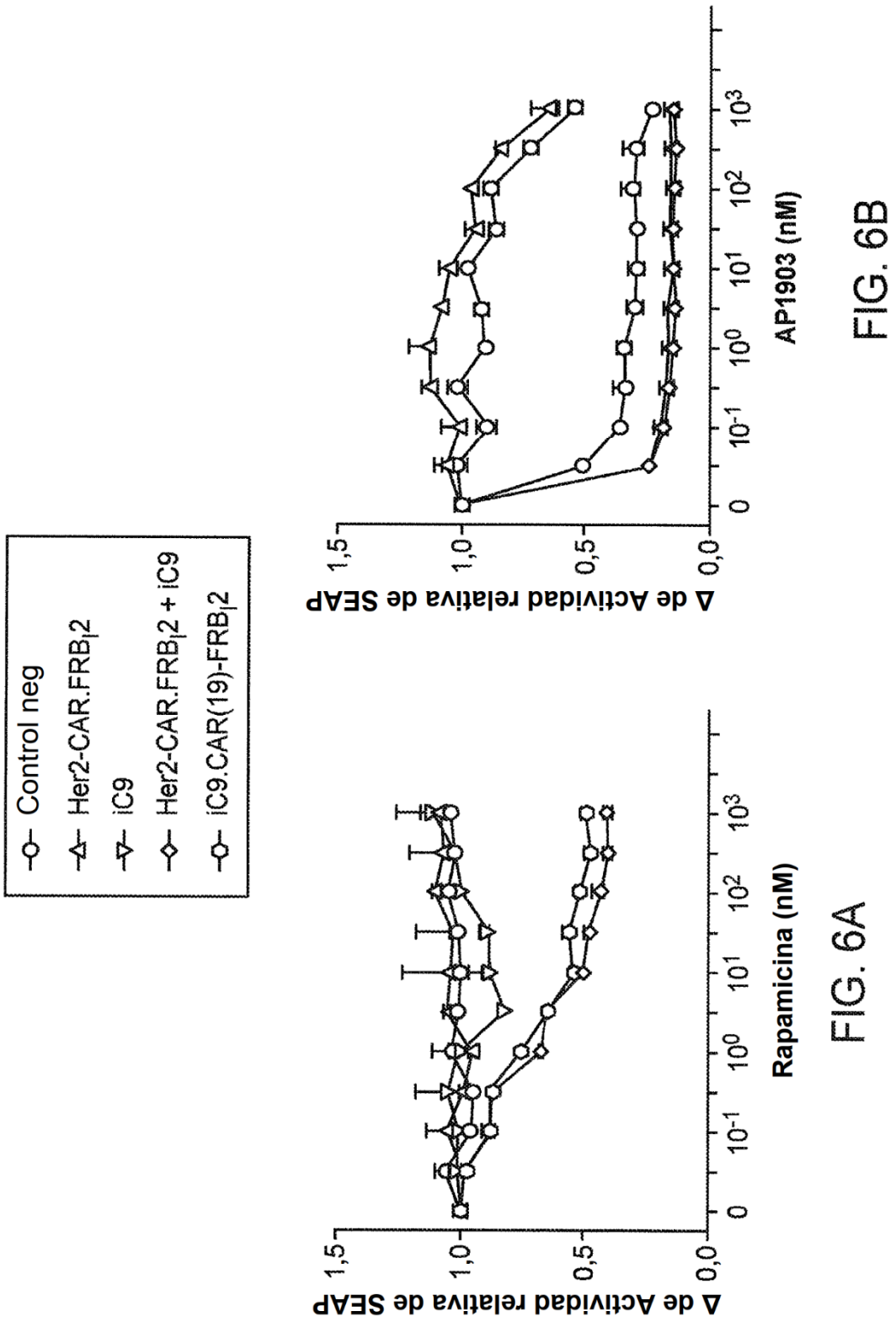

Control neg
Her2-CAR.FRBL2
iC9
Her2-CAR.FRBL2 + iC9
iC9.CAR(19)-FRBL2
Δ de Actividad relativa de SEAP
1,5
1,0
0,5
0,0
0
10-1
100
101
102
103
Rapamicina (nM)
AP1903 (nM)

FIG. 6A

FIG. 6B

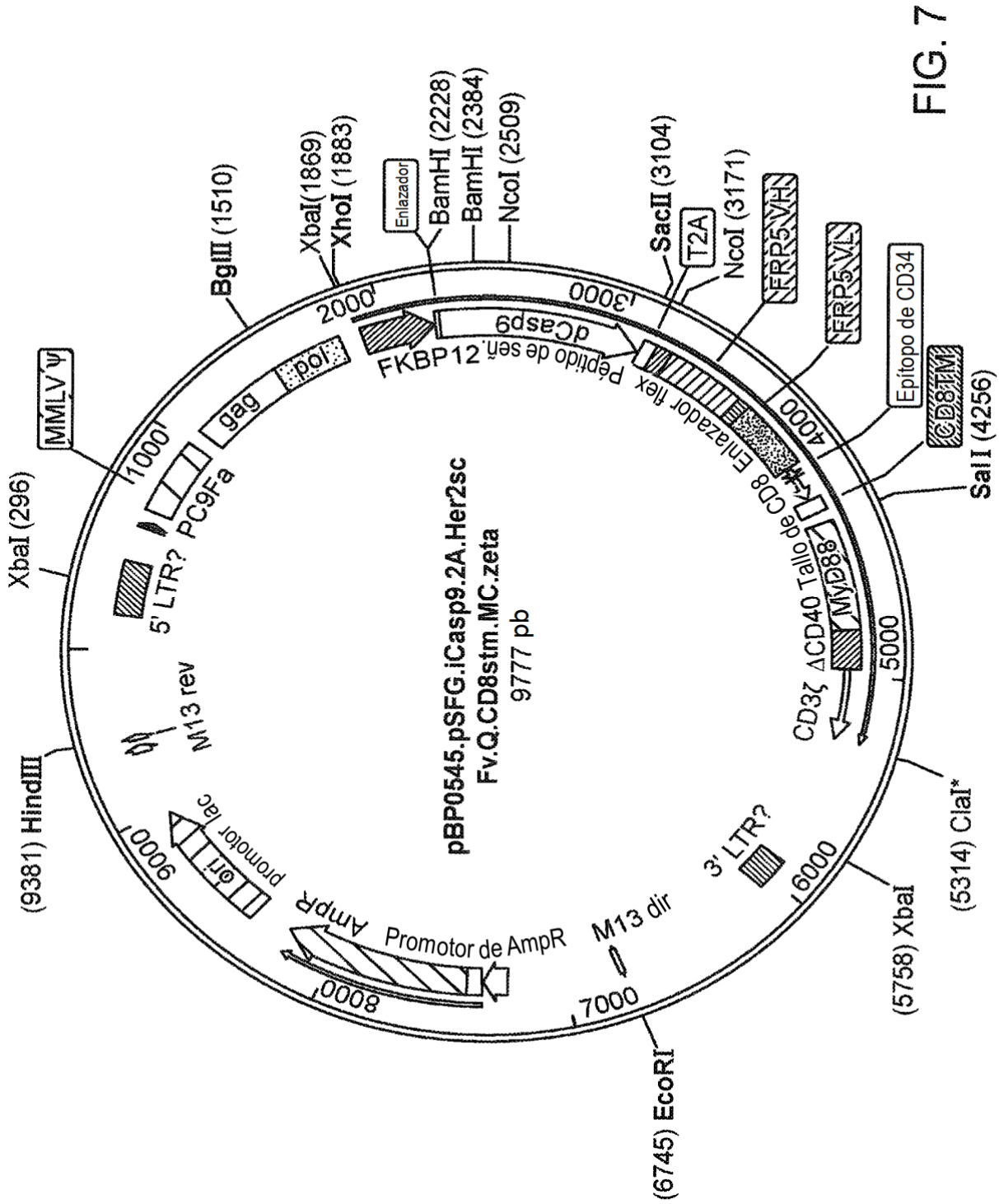

pBP0545.pSFG.iCasp9.2A.Her2sc
Fv.Q.CD8stm.MC.zeta
9777 pb
MMLV Ψ
gag
pol
FKBP12
dCasp9
Péptido de señ.
Enlazador flex
CD8 Enlazador
Tallo de
MyD88
CD3ζ
ΔCD40
FRP5 VH
FRP5 VL
Epítopo de CD34
CD8TM
SalI (4256)
(5314) ClaI*
(5758) XbaI
(6745) EcoRI
(9381) HindIII
XbaI (296)
5' LTR?
PC9Fa
M13 rev
promotor lac
ori
AmpR
Promotor de AmpR
M13 dir
3' LTR?
BglII (1510)
XbaI(1869)
XhoI (1883)
Enlazador
BamHI (2228)
BamHI (2384)
NcoI (2509)
SacII (3104)
T2A
NcoI (3171)
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000
9000

FIG. 7

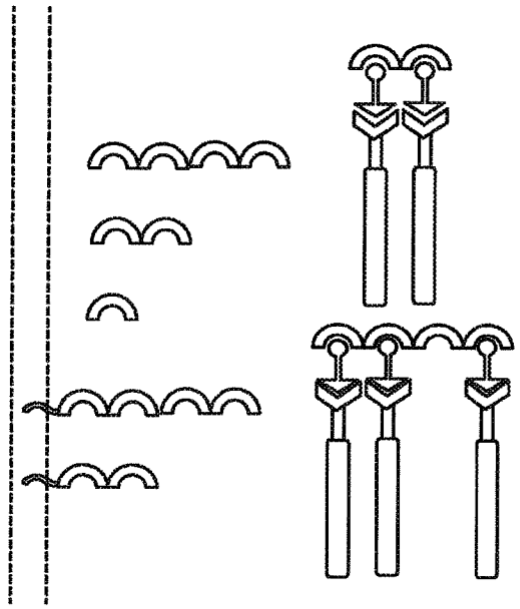


FIG. 8C

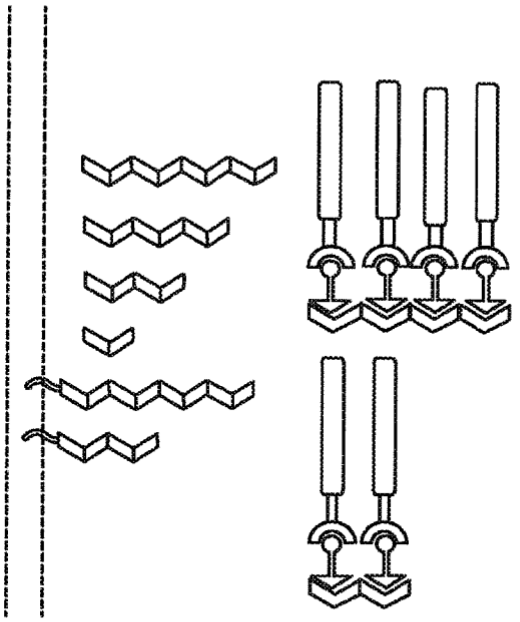


FIG. 8B

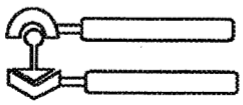
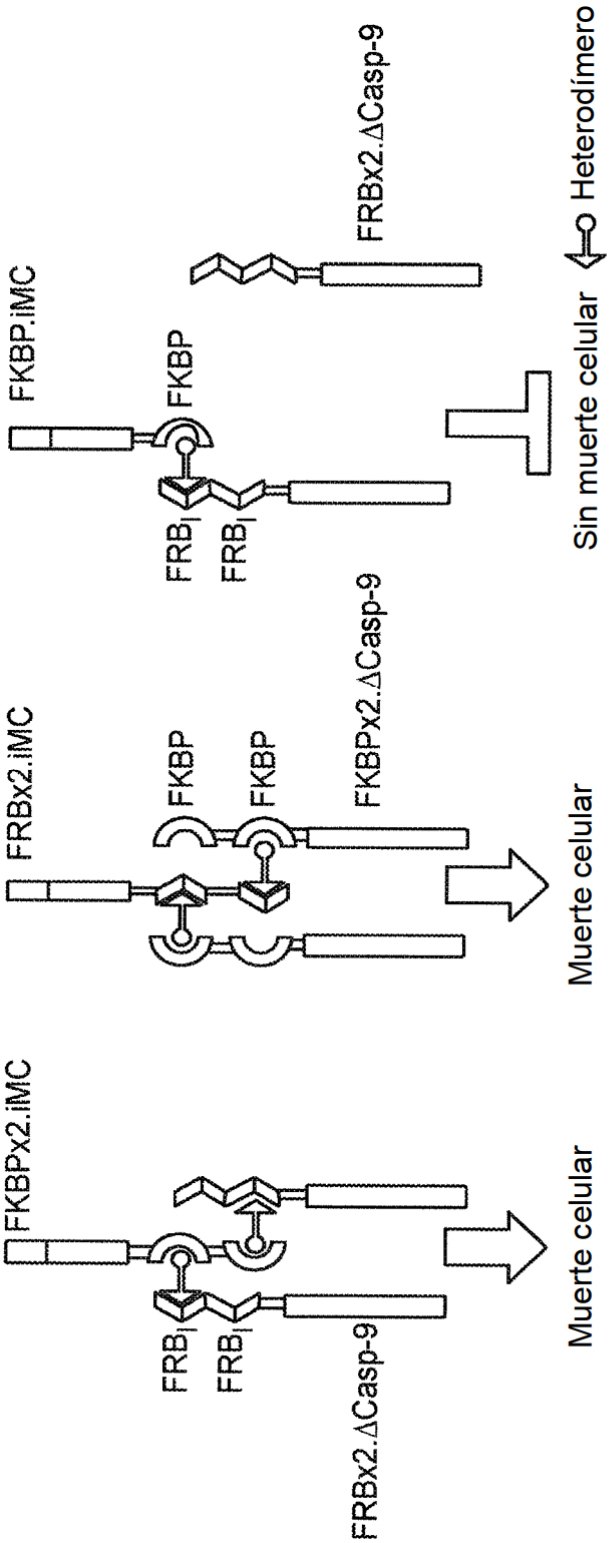


FIG. 8A


FKBPx2.iMC
FRB
FRB
FRBx2.ΔCasp-9
Muerte celular
FIG. 9A
FRBx2.iMC
FKBP
FKBP
FKBPx2.ΔCasp-9
Muerte celular
FIG. 9B
FKBP.iMC
FKBP
FRB
FRB
FRBx2.ΔCasp-9
Heterodímero
Sin muerte celular
FIG. 9C

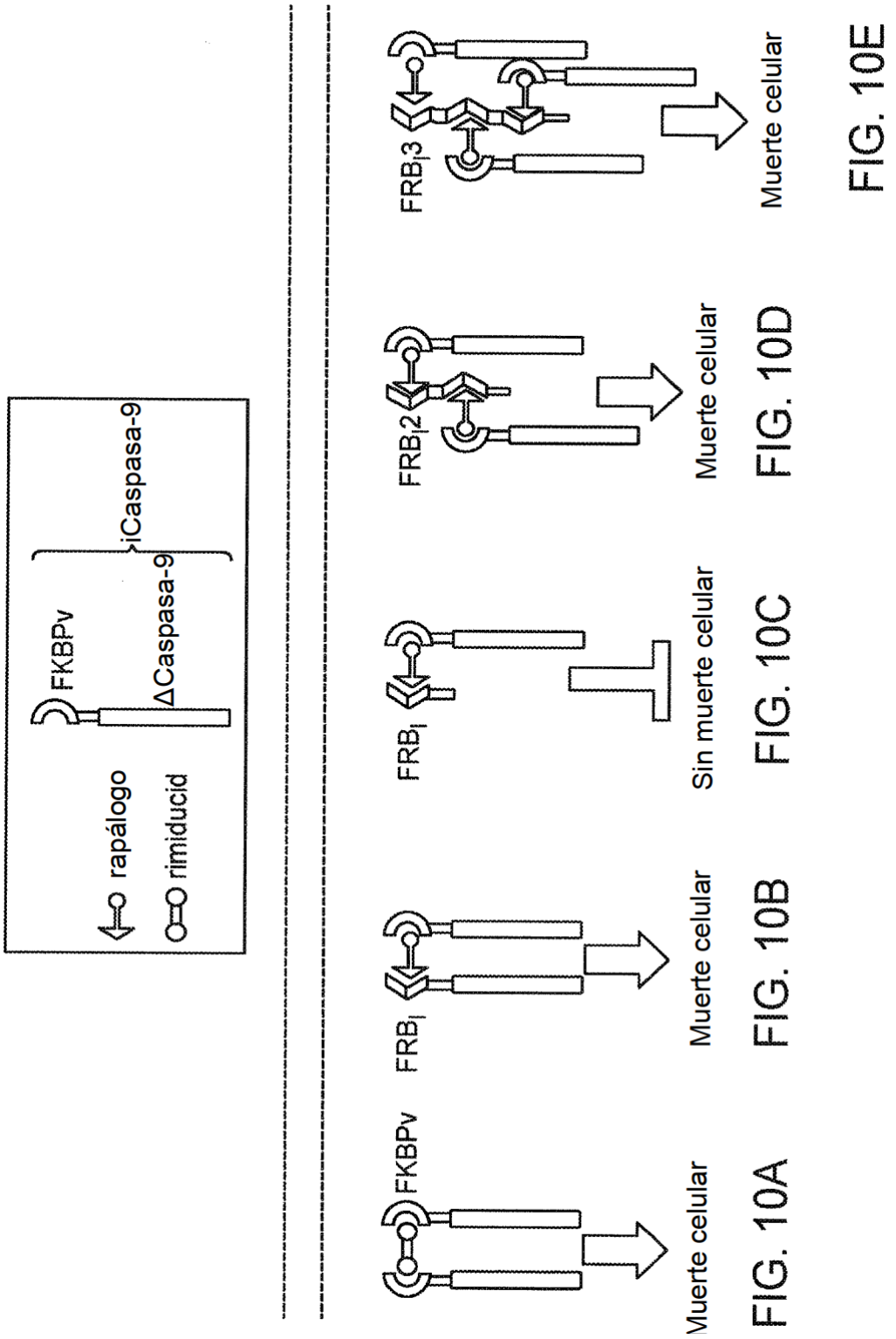


FIG. 10A FIG. 10B FIG. 10C FIG. 10D FIG. 10E

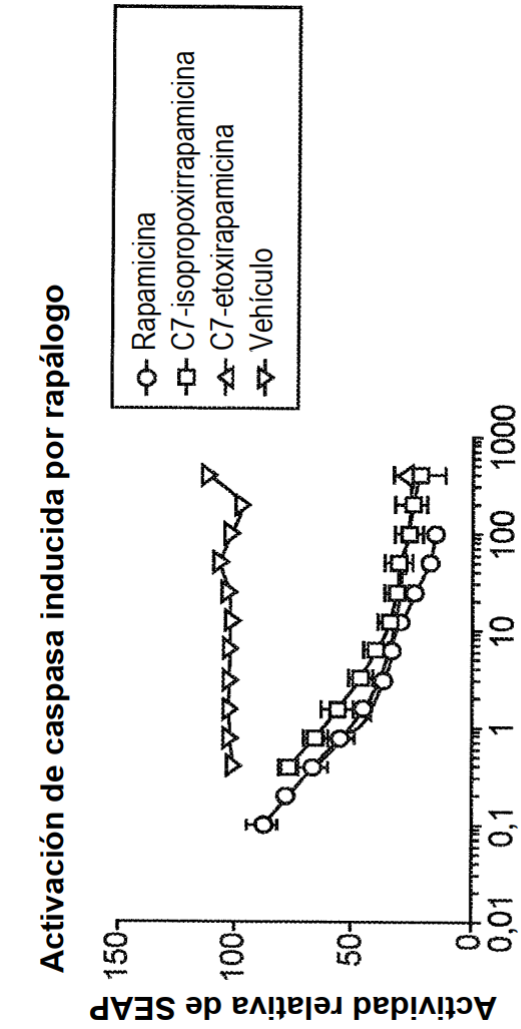


FIG. 11B

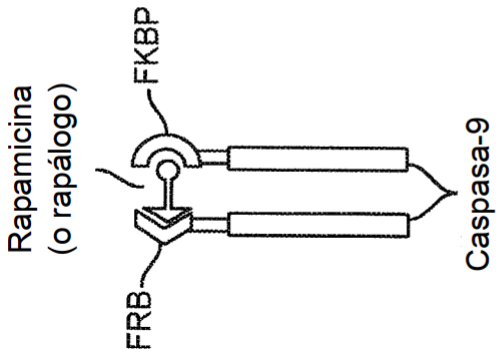


FIG. 11A

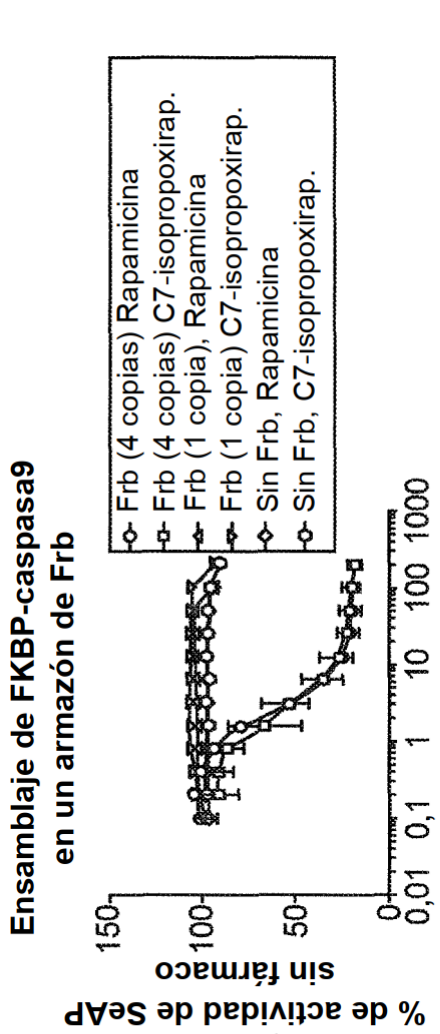


FIG. 12B

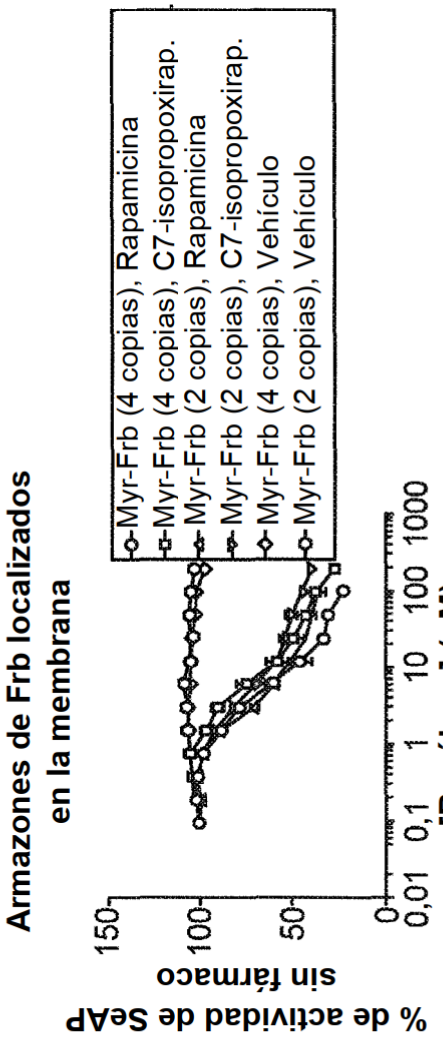


FIG. 12C

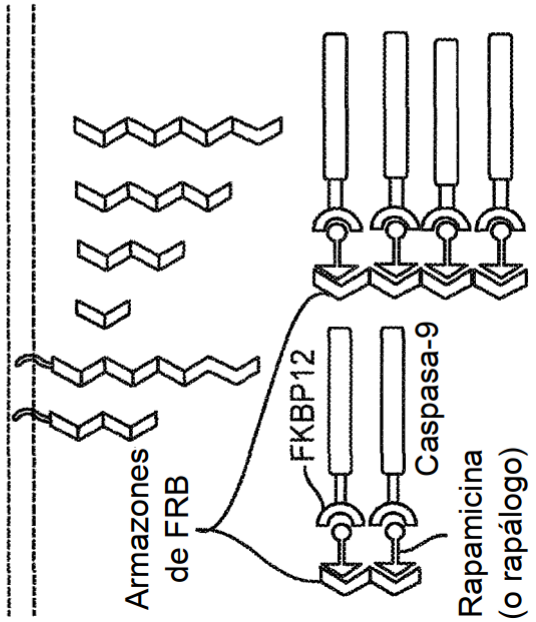


FIG. 12A

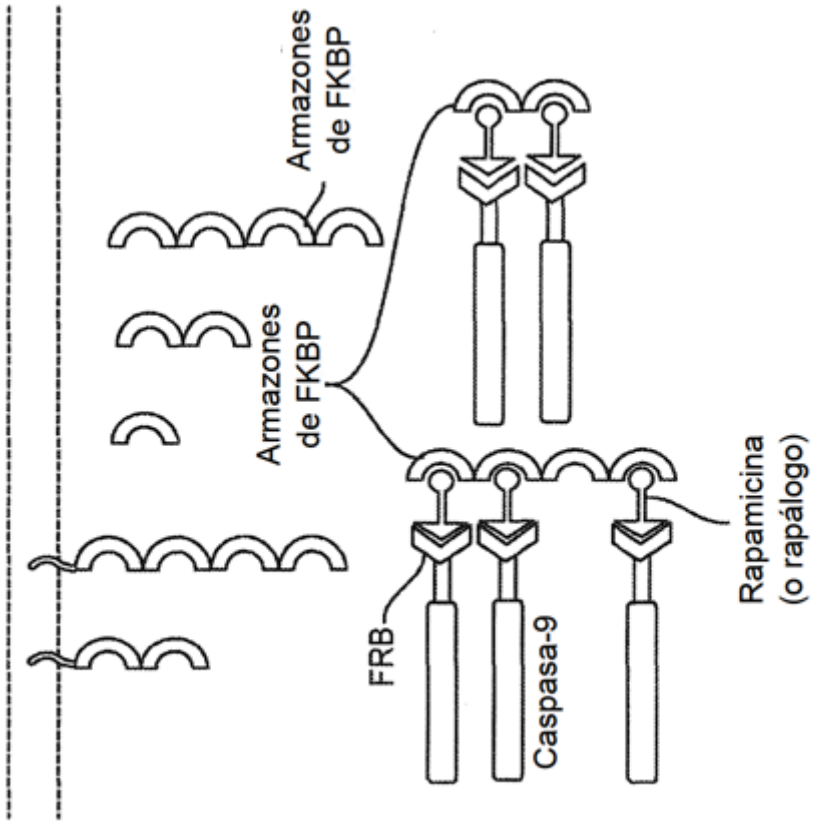


FIG. 13A

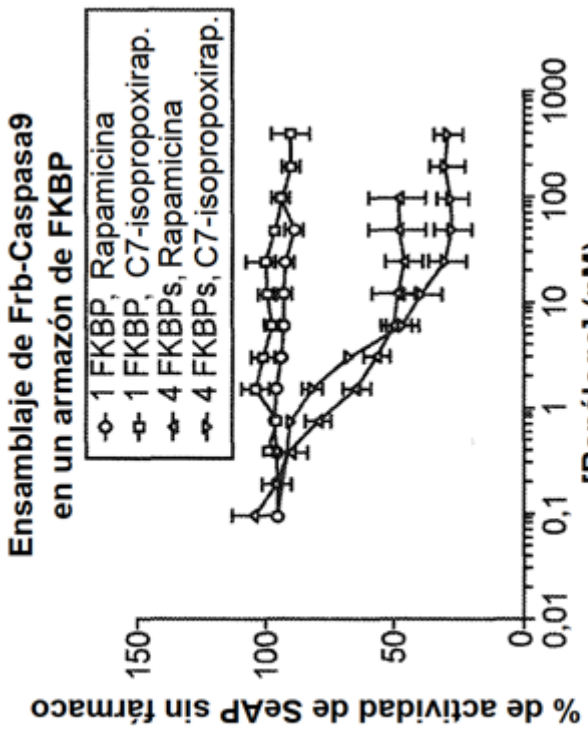


FIG. 13B

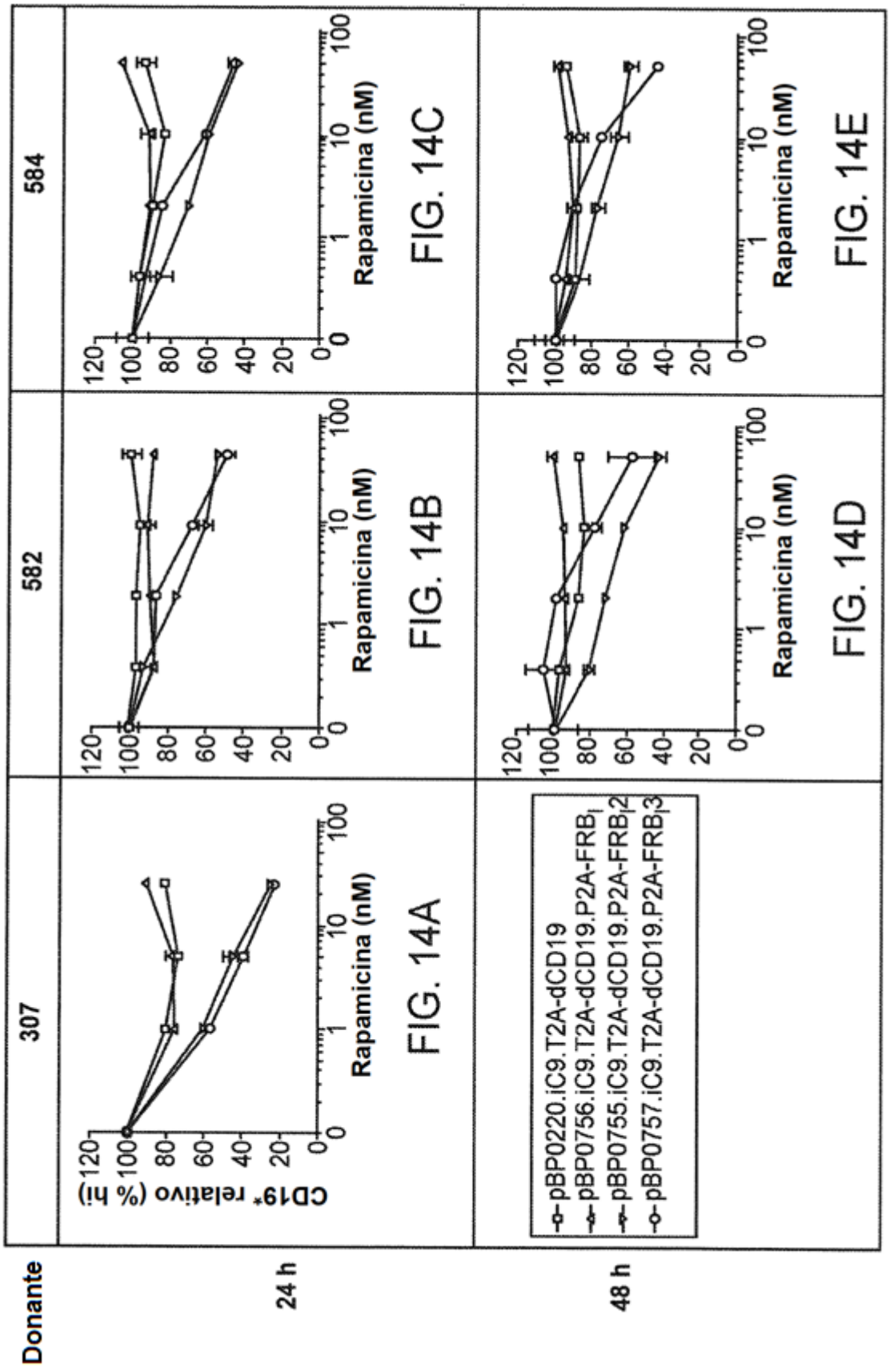


FIG. 14A

FIG. 14B

FIG. 14C

FIG. 14D

FIG. 14E

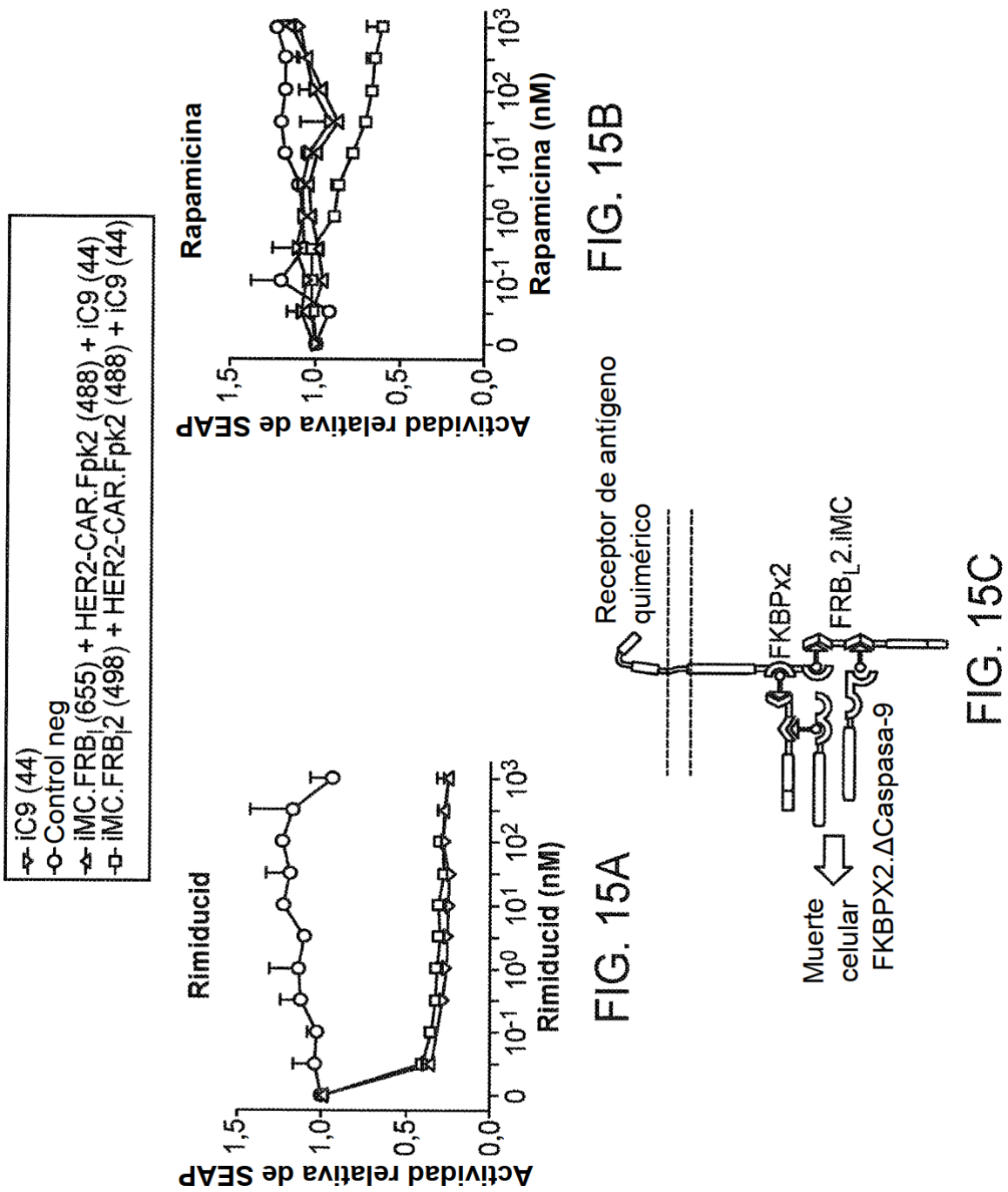


FIG. 15A

FIG. 15B

FIG. 15C

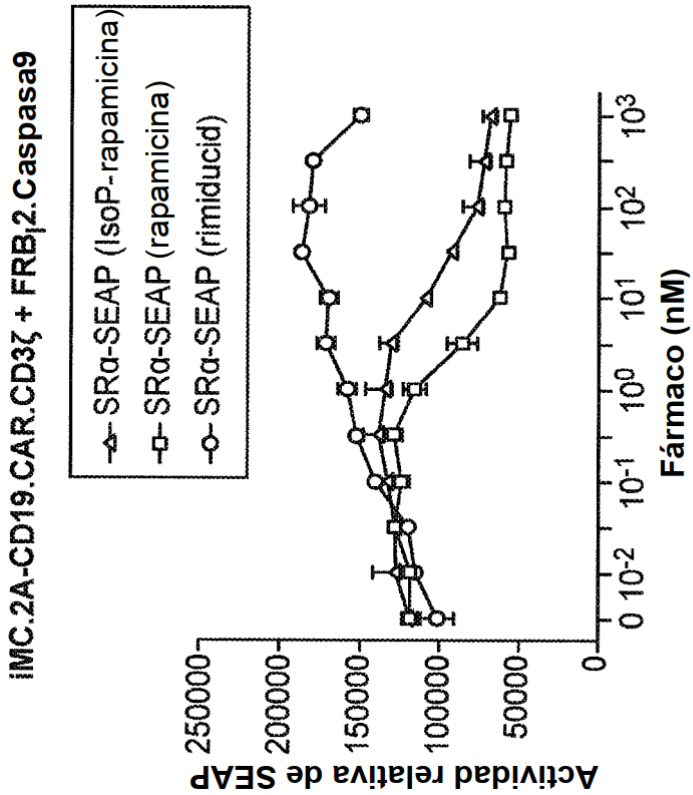


FIG. 16B

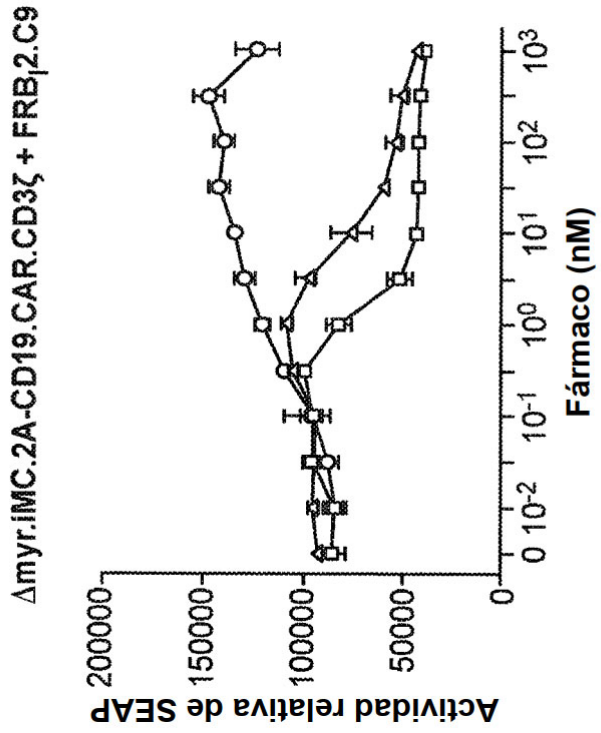


FIG. 16A

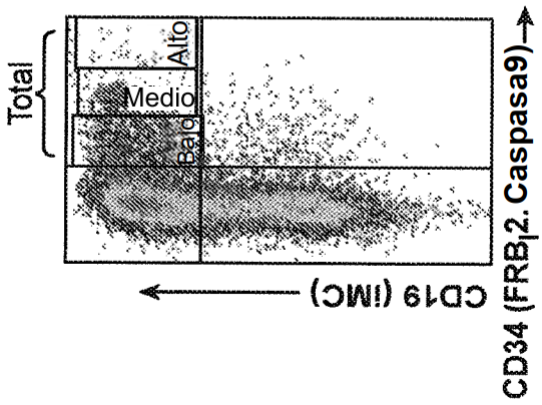


FIG. 17B

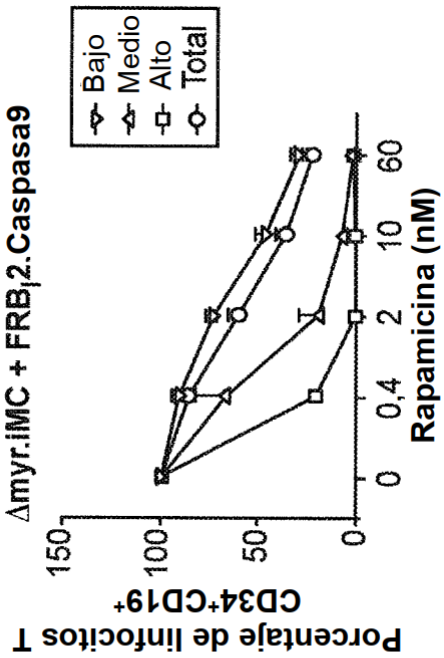


FIG. 17A

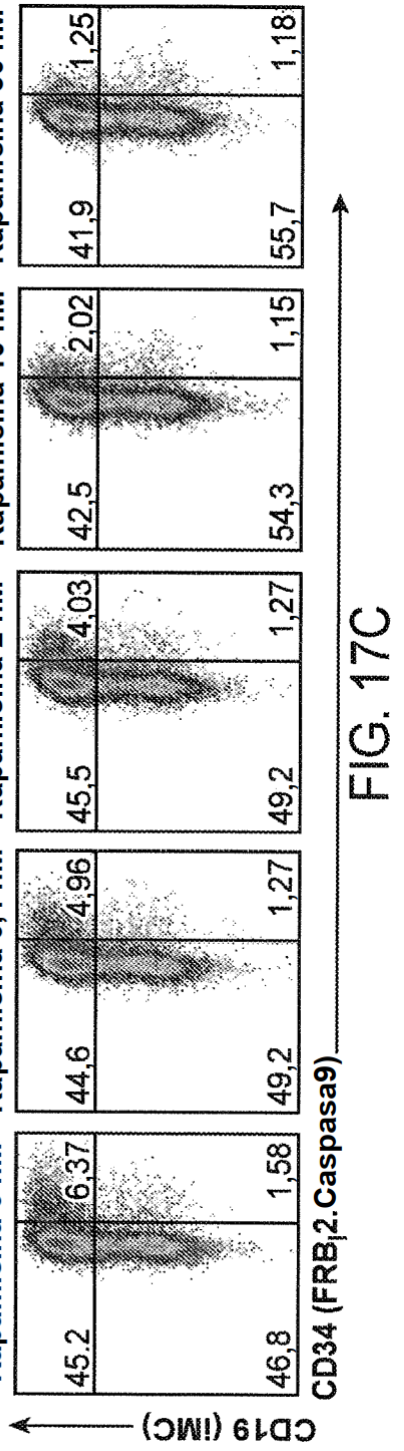


FIG. 17C

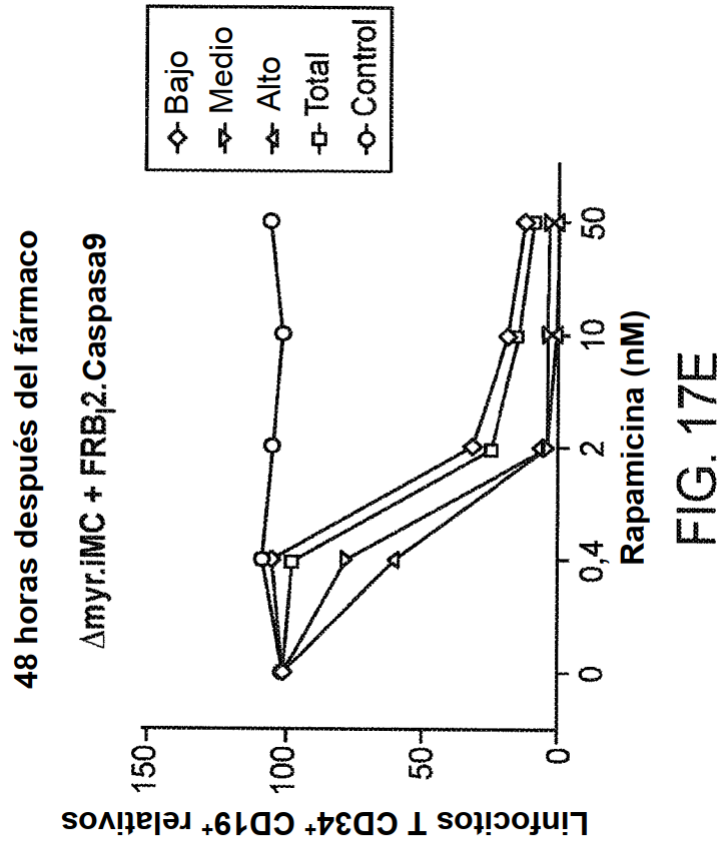


FIG. 17E

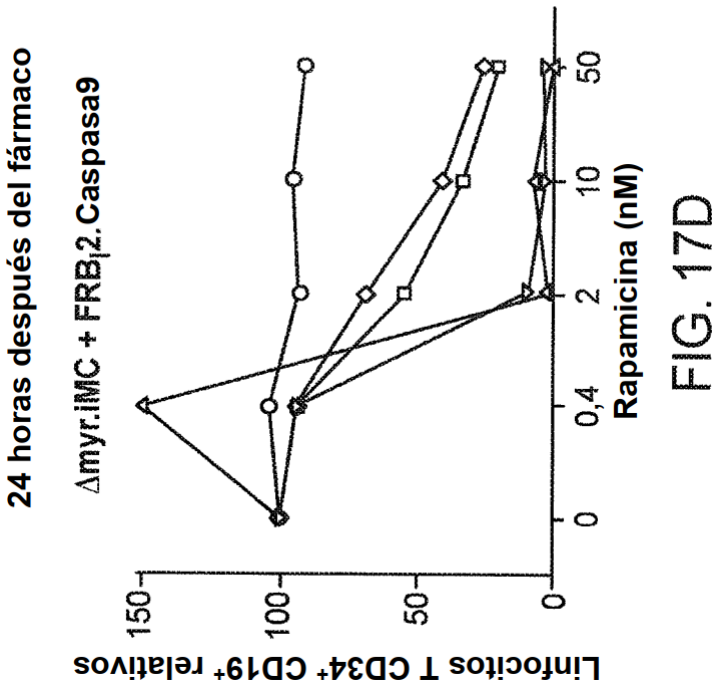


FIG. 17D

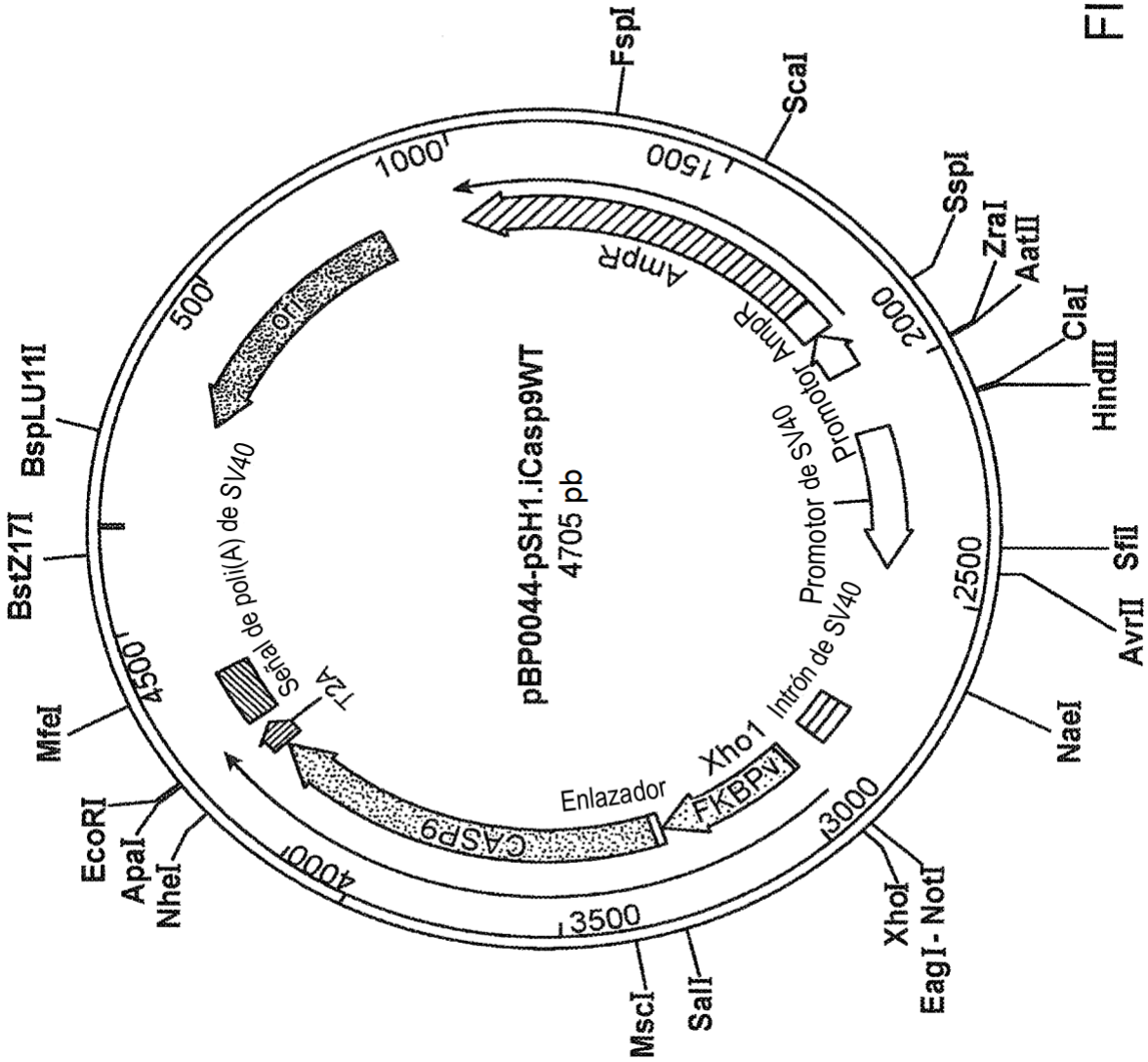

pBP0044-pSH1.iCasp9WT
4705 pb
AmpR
Promotor de SV40
Intrón de SV40
Xho1
FKBPv
Enlazador
CASP9
T2A
Señal de poli(A) de SV40
ori
FspI
ScaI
SspI
ZraI
AatII
ClaI
HindIII
SfiI
AvrII
NaeI
XhoI
EagI - NotI
SalI
MscI
NheI
ApaI
EcoRI
MfeI
BstZ17I
BspLU11I
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500
4000
4500

FIG. 18

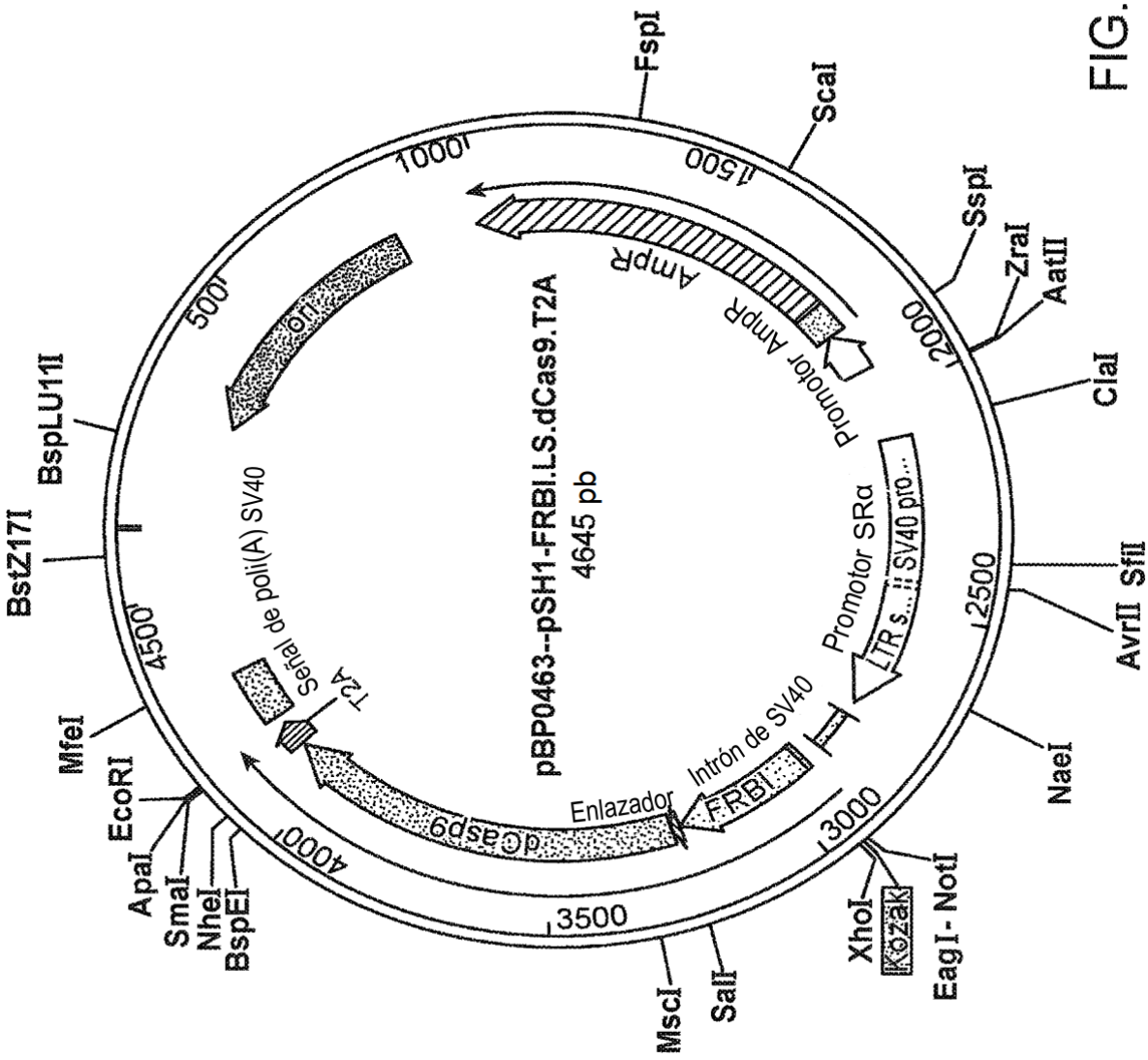

pBP0463--pSH1-FRBI.LS.dCas9.T2A
4645 pb
FspI
ScaI
SspI
ZraI
AatII
ClaI
AvrII
SfiI
NaeI
NotI
XhoI
Kozak
SalI
MscI
BspEI
NheI
SmaI
ApaI
EcoRI
MfeI
BstZ17I
BspLU11I
ori
AmpR
Promotor AmpR
Promotor SRα
LTR s... ;; SV40 pro...
Intrón de SV40
FRBI
Enlazador
dCas9
T2A
Señal de poli(A) SV40
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500
4000
4500

FIG. 19

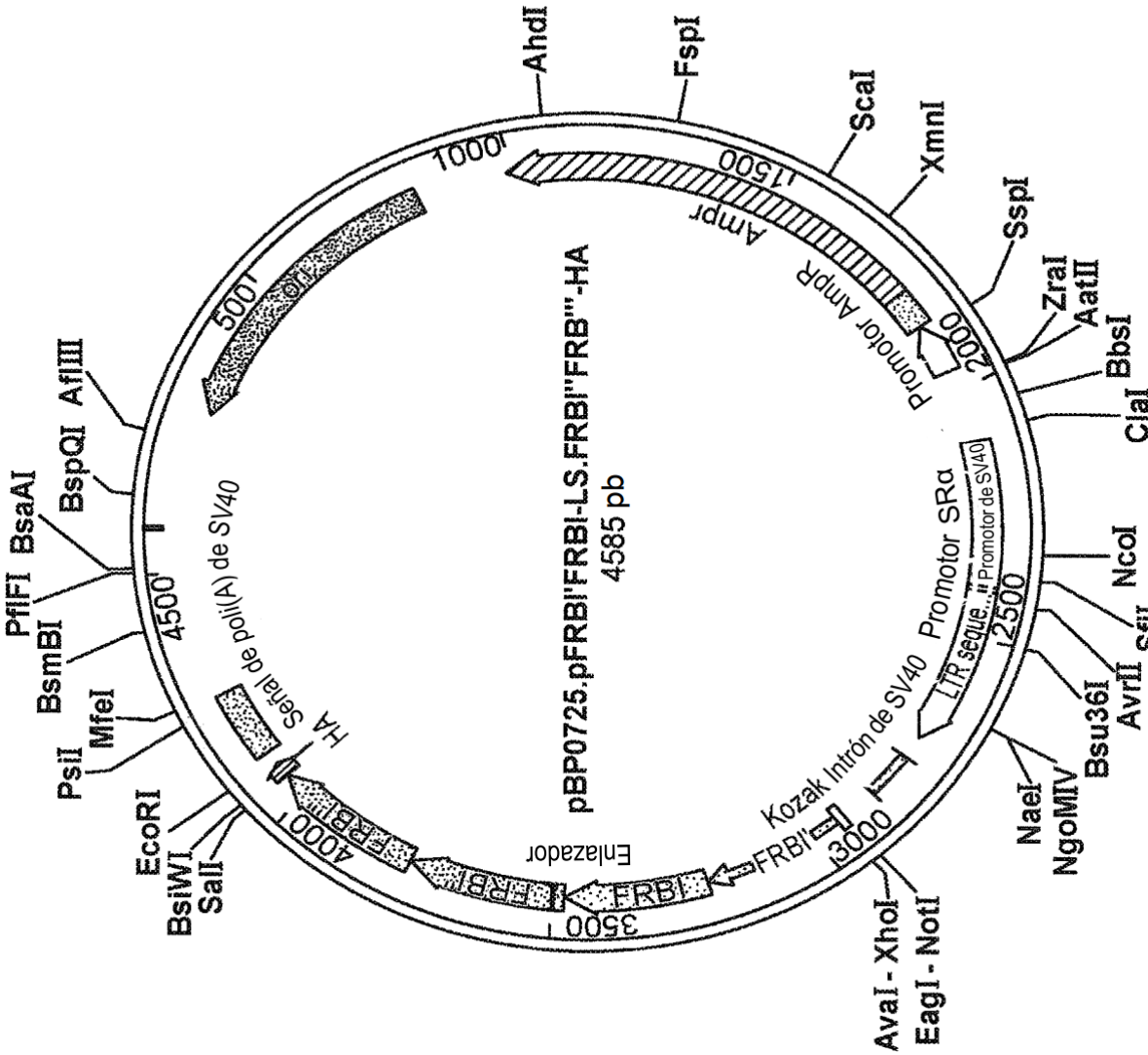

pBP0725.pFRBI'FRBI-LS.FRBI''FRB'''-HA
4585 pb
AhdI
FspI
ScaI
XmnI
SspI
ZraI
AatII
BbsI
ClaI
NcoI
SfiI
AvrII
Bsu36I
NaeI
NgoMIV
AvaI - XhoI
EagI - NotI
AflIII
BspQI
BsaAI
PflFI
BsmBI
MfeI
PsiI
EcoRI
BsiWI
SalI
1000
1500
2000
2500
3000
3500
4000
4500
5000
AmpR
Promotor AmpR
Promotor SRα
LTR segue...
Promotor de SV40
Kozak Intrón de SV40
FRBI'
FRBI
FRBI
Enlazador
HA
Señal de poli(A) de SV40
ori

FIG. 20

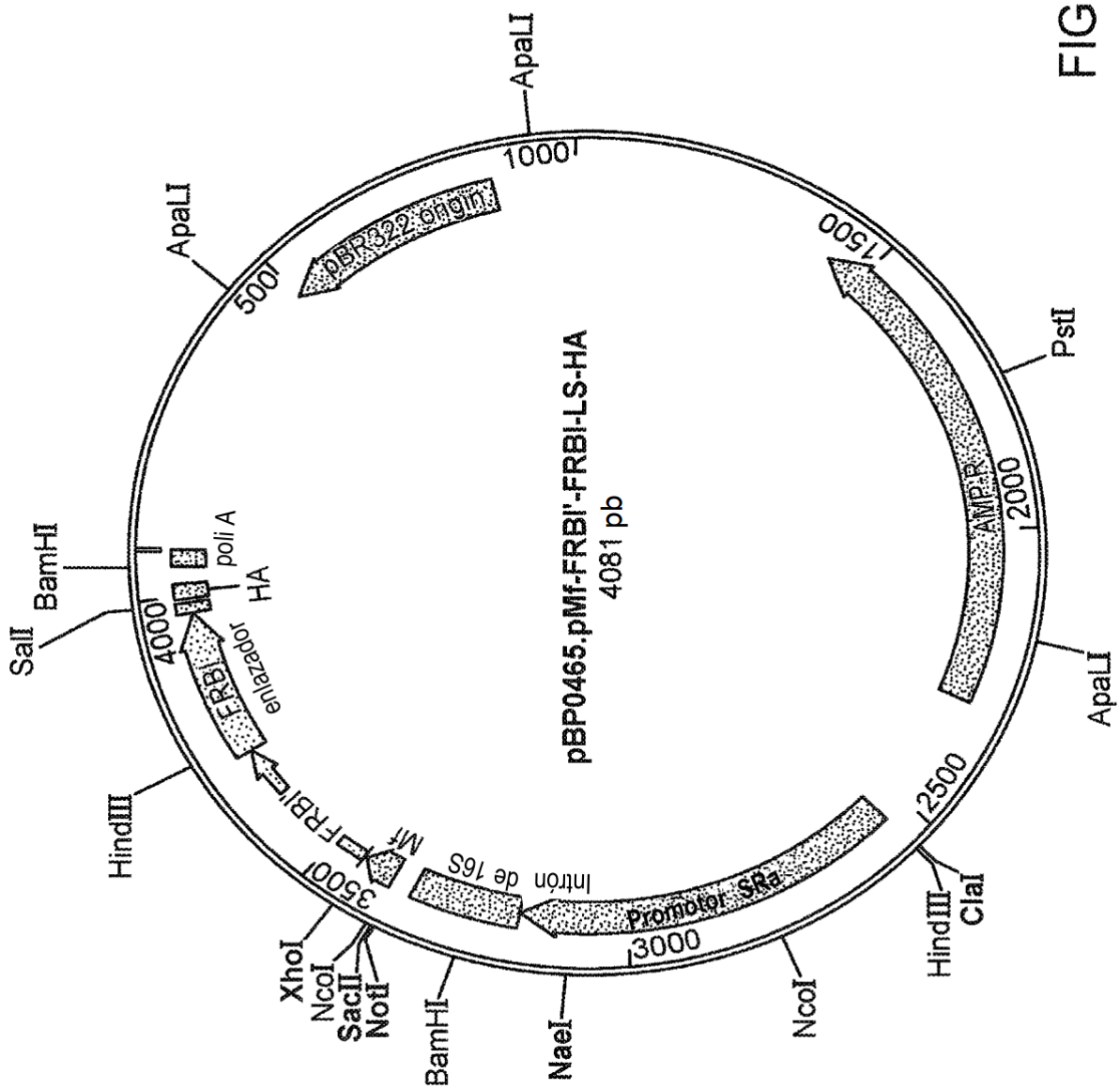
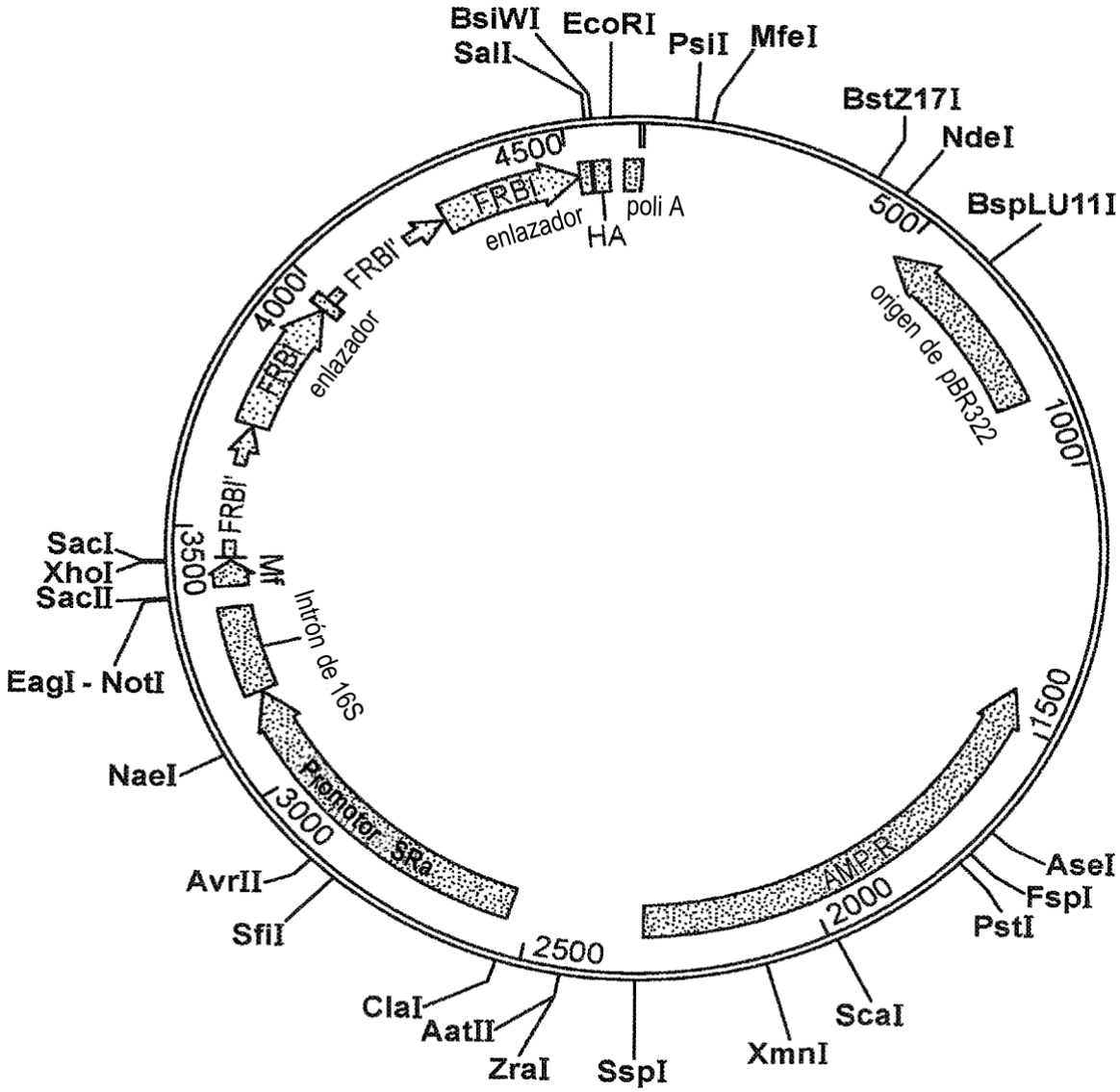

pBP0465.pMf-FRBI'-FRBI-LS-HA
4081 pb
ApaLI
PstI
ApaLI
ClaI
HindIII
NcoI
NaeI
BamHI
NotI
SacII
NcoI
XhoI
HindIII
BamHI
SalI
1000
1500
2000
2500
3000
3500
4000
500
pBR322 origin
AMP R
Promotor SRa
Intrón de 16S
Mf
FRBI
enlazador
FRBI
HA
poli A

FIG. 21



pBP0721--pSH1-pMf-FRBI'-FRBI-LS-FRB''-FRB'''-LS-HA
4627 pb

FIG. 22

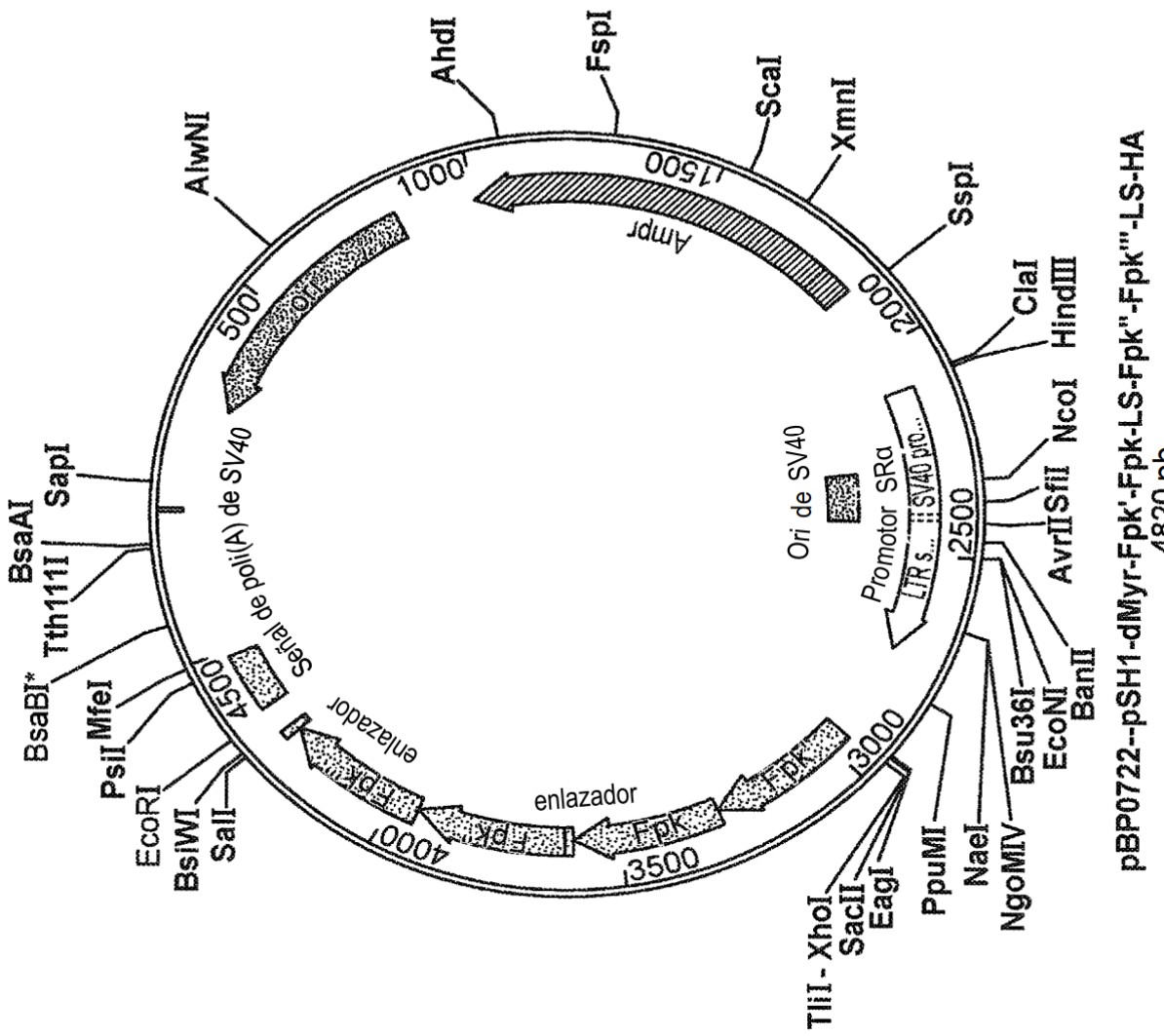


FIG. 23

pBP0722--pSH1-dMyr-Fpk'-Fpk-LS-Fpk''-Fpk'''-LS-HA
4820 pb

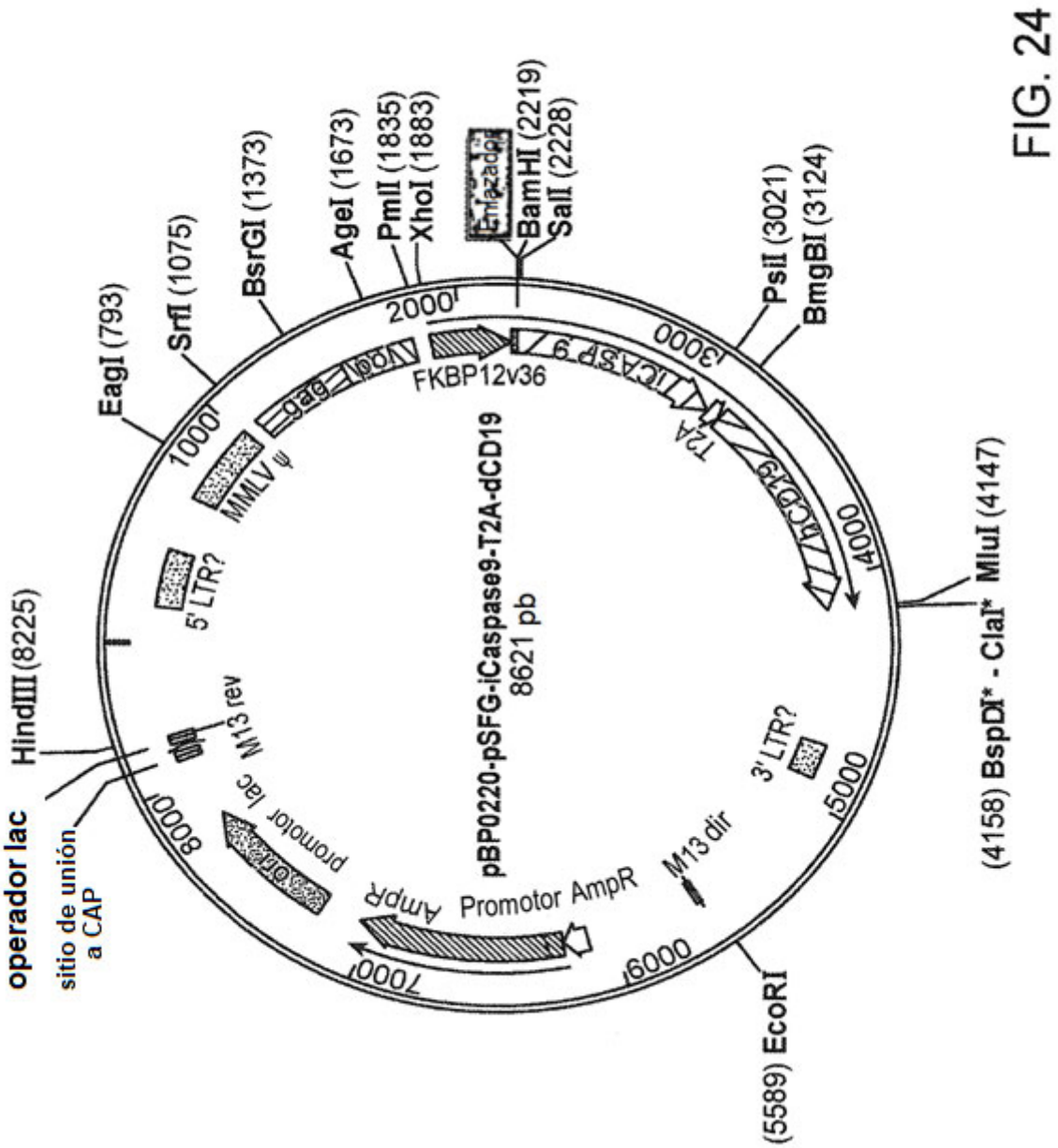

pBP0220-pSFG-iCaspase9-T2A-dCD19
8621 pb
HindIII (8225)
operador lac
sitio de unión a CAP
EagI (793)
SrfI (1075)
BsrGI (1373)
AgeI (1673)
PmlI (1835)
XhoI (1883)
BamHI (2219)
SalI (2228)
PsiI (3021)
BmgBI (3124)
(4158) BspDI* - ClaI*
MluI (4147)
(5589) EcoRI
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000
MMLV ψ
gag
Vgd
FKBP12v36
iCASP 9
T2A
dCD19
5' LTR?
3' LTR?
M13 rev
M13 dir
promotor lac
Promotor AmpR
AmpR

FIG. 24

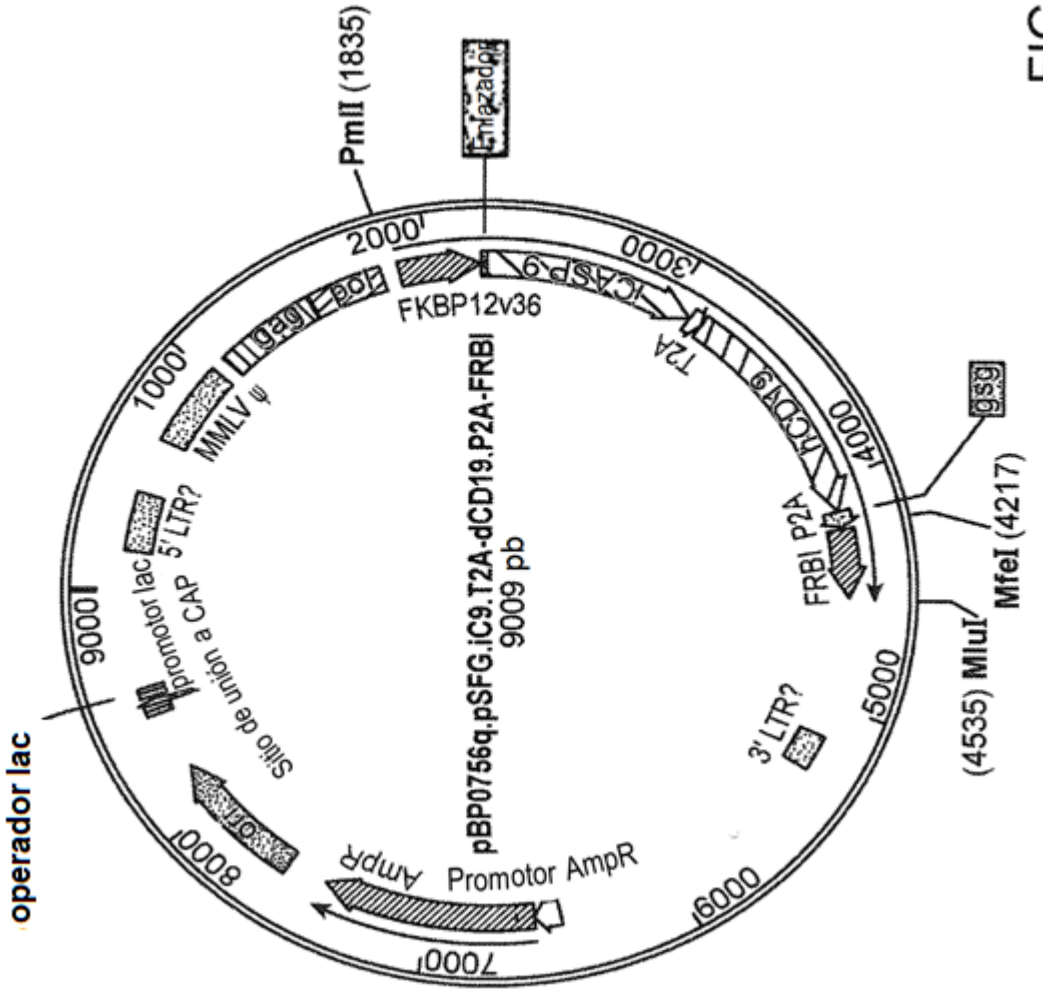

PmlI (1835)
Enlazador
FKBP12v36
iCASP.9
T2A
iCD19
FRBI P2A
gsg
MfeI (4217)
MluI (4535)
3' LTR?
Promotor AmpR
AmpR
ori
Sitio de unión a CAP
promotor lac
5' LTR?
MMLV ψ
gag
pol
operador lac
pBP0756q.pSFG.iC9.T2A-dCD19.P2A-FRBI
9009 pb
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000
9000

FIG. 25

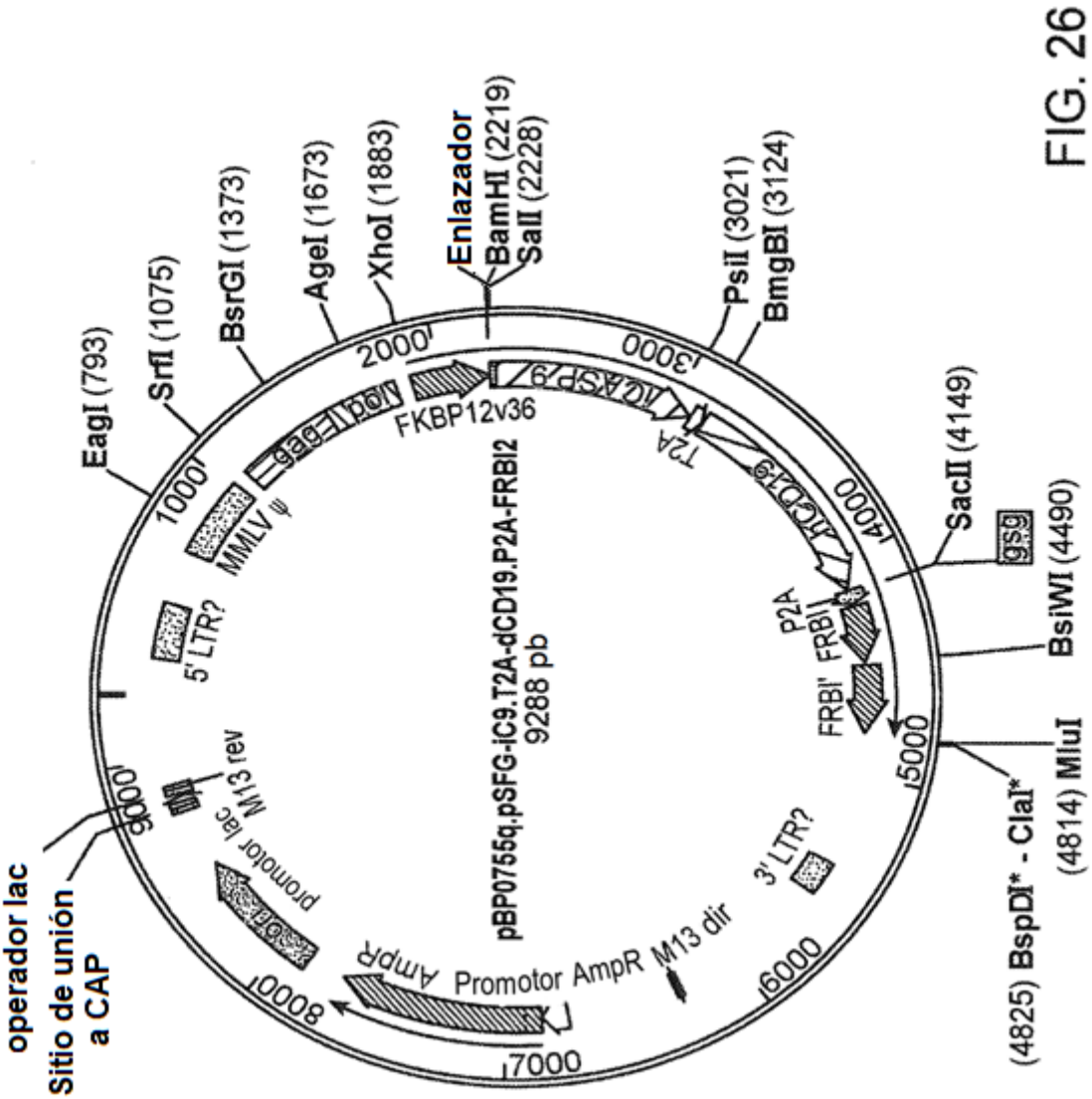

pBP0755q.pSFG-iC9.T2A-dCD19.P2A-FRBI2
9288 pb
EagI (793)
SrfI (1075)
BsrGI (1373)
AgeI (1673)
XhoI (1883)
Enlazador
BamHI (2219)
SalI (2228)
PsiI (3021)
BmgBI (3124)
SacII (4149)
BsiWI (4490)
MluI
(4814)
(4825) BspDI* - ClaI*
operador lac
Sitio de unión a CAP
5' LTR?
MMLV ψ
Rod I-Beb
FKBP12v36
T2A
dCD19
P2A
FRBI
FRBI'
3' LTR?
M13 rev
promotor lac
AmpR
Promotor AmpR
M13 dir
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000
9000

FIG. 26

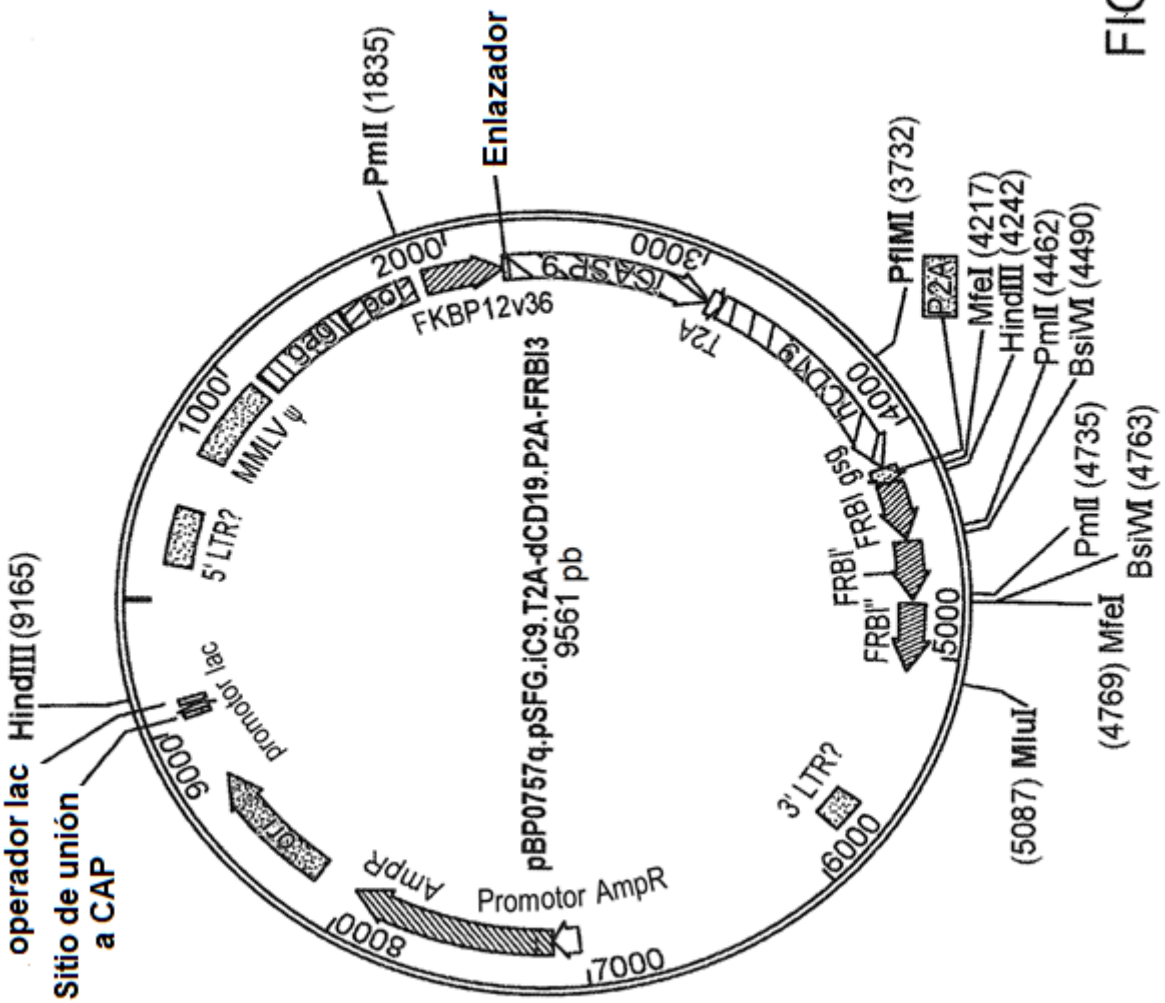

pBP0757q.pSFG.iC9.T2A-dCD19.P2A-FRBI3
9561 pb
PmlI (1835)
Enlazador
PflMI (3732)
MfeI (4217)
HindIII (4242)
PmlI (4462)
BsiWI (4490)
PmlI (4735)
BsiWI (4763)
(4769) MfeI
(5087) MluI
HindIII (9165)
operador lac
Sitio de unión a CAP
FKBP12v36
T2A
P2A
FRBI'
FRBI
FRBI"
5' LTR?
3' LTR?
MMLV ψ
gag
pol
env
Promotor lac
AmpR
Promotor AmpR
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000
9000

FIG. 27

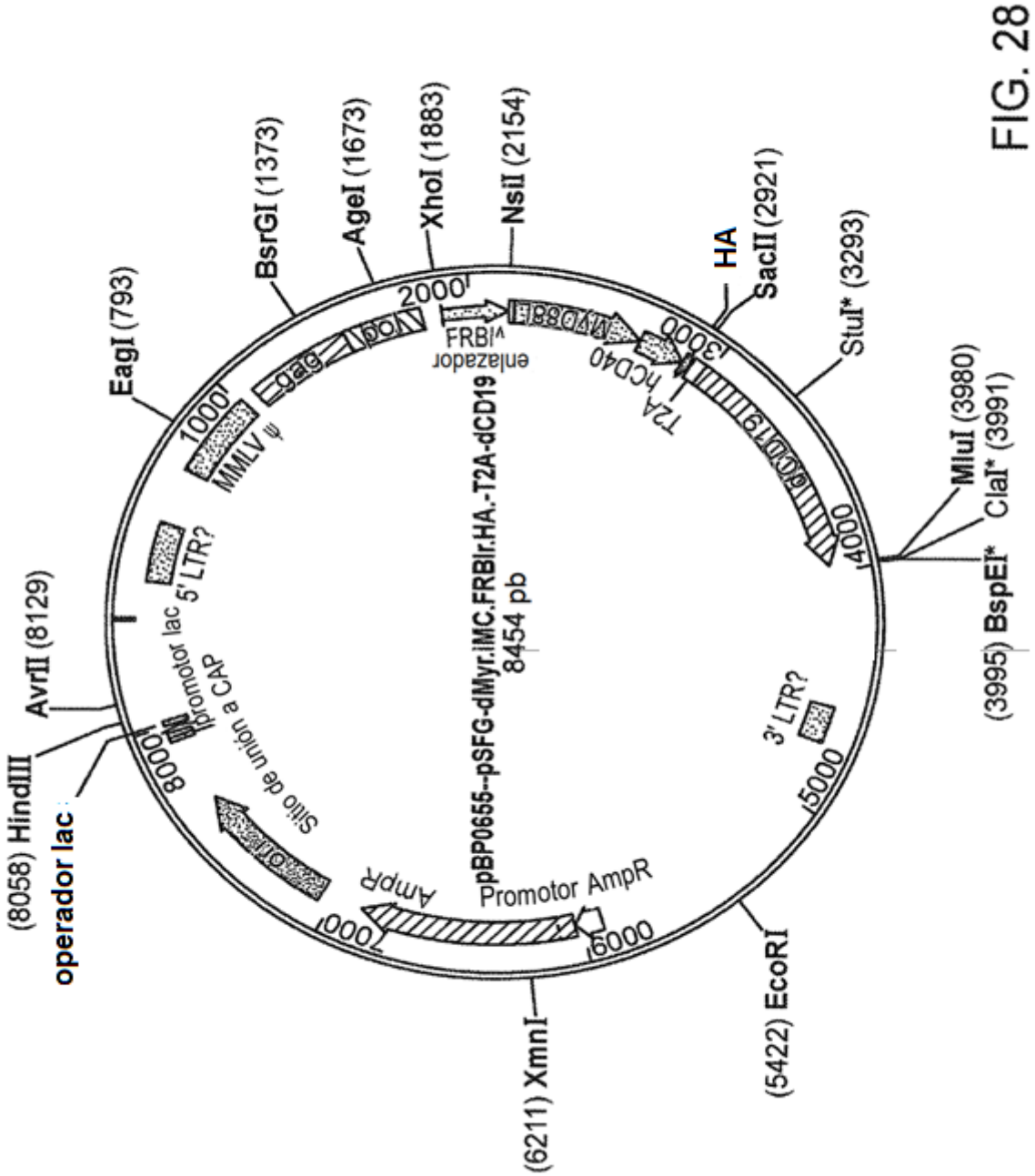

ppBP0655--pSFG-dMyr.iMC.FRBIr.HA.-T2A-dCD19
8454 pb
EagI (793)
BsrGI (1373)
AgeI (1673)
XhoI (1883)
NsiI (2154)
HA
SacII (2921)
StuI* (3293)
MluI (3980)
ClaI* (3991)
(3995) BspEI*
(5422) EcoRI
(6211) XmnI
(8058) HindIII
AvrII (8129)
operador lac
MMLV ψ
5' LTR?
promotor lac
Sitio de unión a CAP
AmpR
Promotor AmpR
3' LTR?
T2A
hCD40
FRBIr
enlazador
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000

FIG. 28

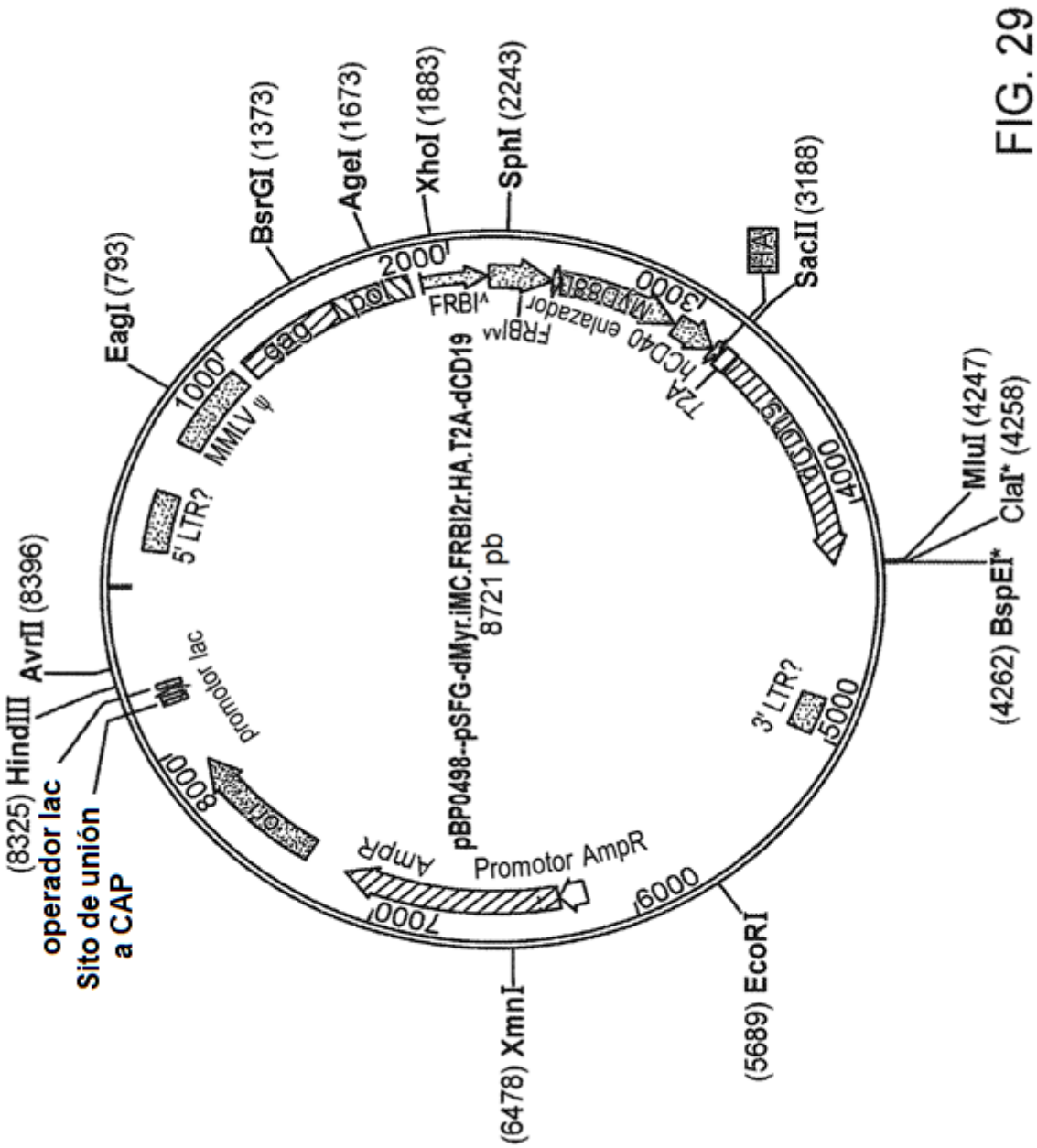

pBP0498--pSFG-dMyr.iMC.FRBI2r.HA.T2A-dCD19
8721 pb
EagI (793)
BsrGI (1373)
AgeI (1673)
XhoI (1883)
SphI (2243)
SacII (3188)
MluI (4247)
ClaI* (4258)
(4262) BspEI*
(5689) EcoRI
(6478) XmnI
(8325) HindIII
AvrII (8396)
operador lac
Sito de unión a CAP
5' LTR?
MMLV ψ
gag
pol
FRBI^
FRBI^a
Myr.iMC
enlazador
hCD40
T2A
hCD19
3' LTR?
promotor lac
ori
AmpR
Promotor AmpR
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000

FIG. 29

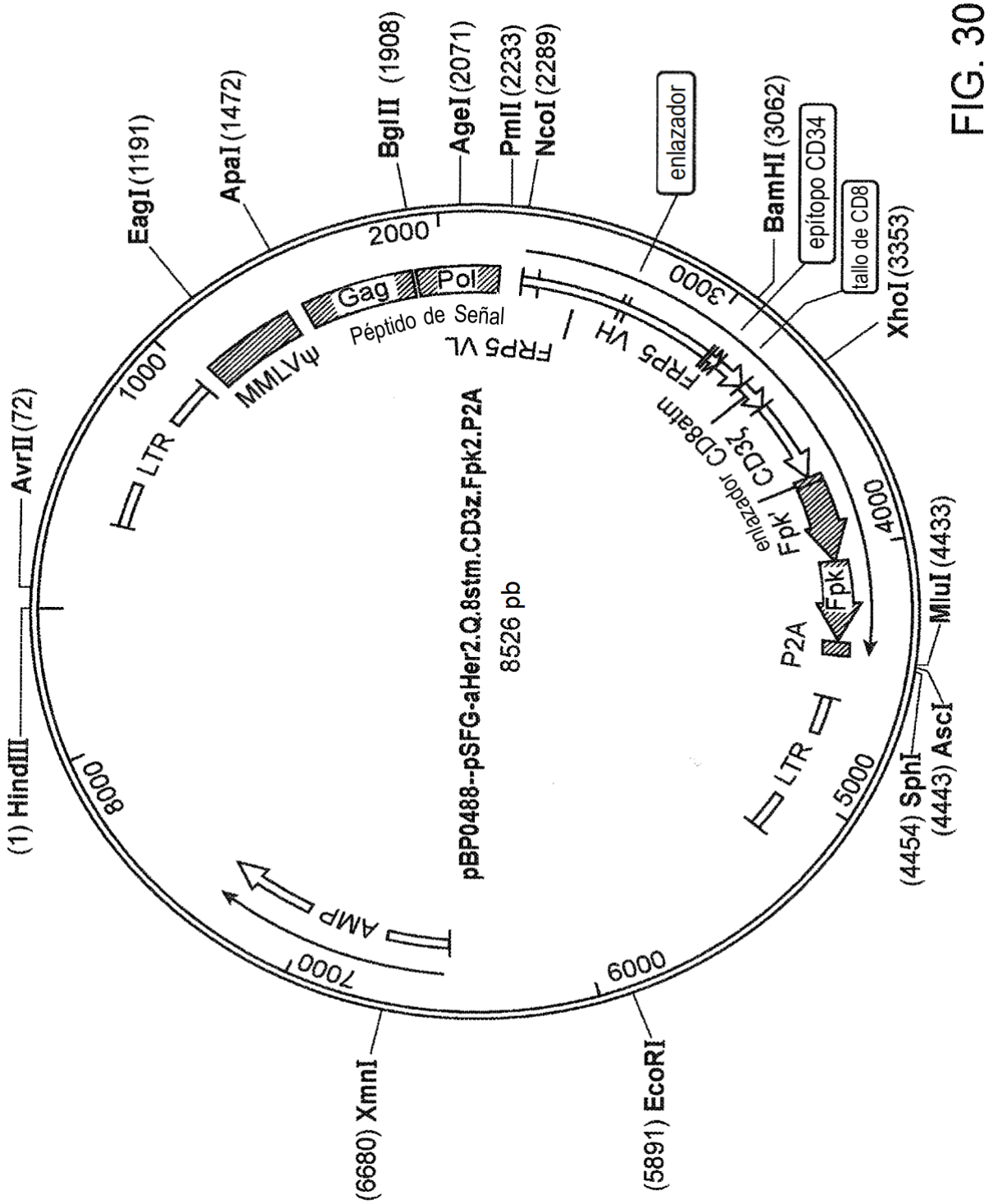

pBP0488--pSFG-aHer2.Q.8stm.CD3z.Fpk2.P2A
8526 pb
(1) HindIII
AvrII (72)
EagI (1191)
ApaI (1472)
BglII (1908)
AgeI (2071)
PmlI (2233)
NcoI (2289)
enlazador
BamHI (3062)
epítopo CD34
tallo de CD8
XhoI (3353)
MluI (4433)
(4443) AscI
(4454) SphI
(5891) EcoRI
(6680) XmnI
LTR
MMLVψ
Gag
Pol
Péptido de Señal
FRP5 VL
FRP5 VH
enlazador
CD3ζ
FpK'
FpK
P2A
LTR
AMP
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000

FIG. 30

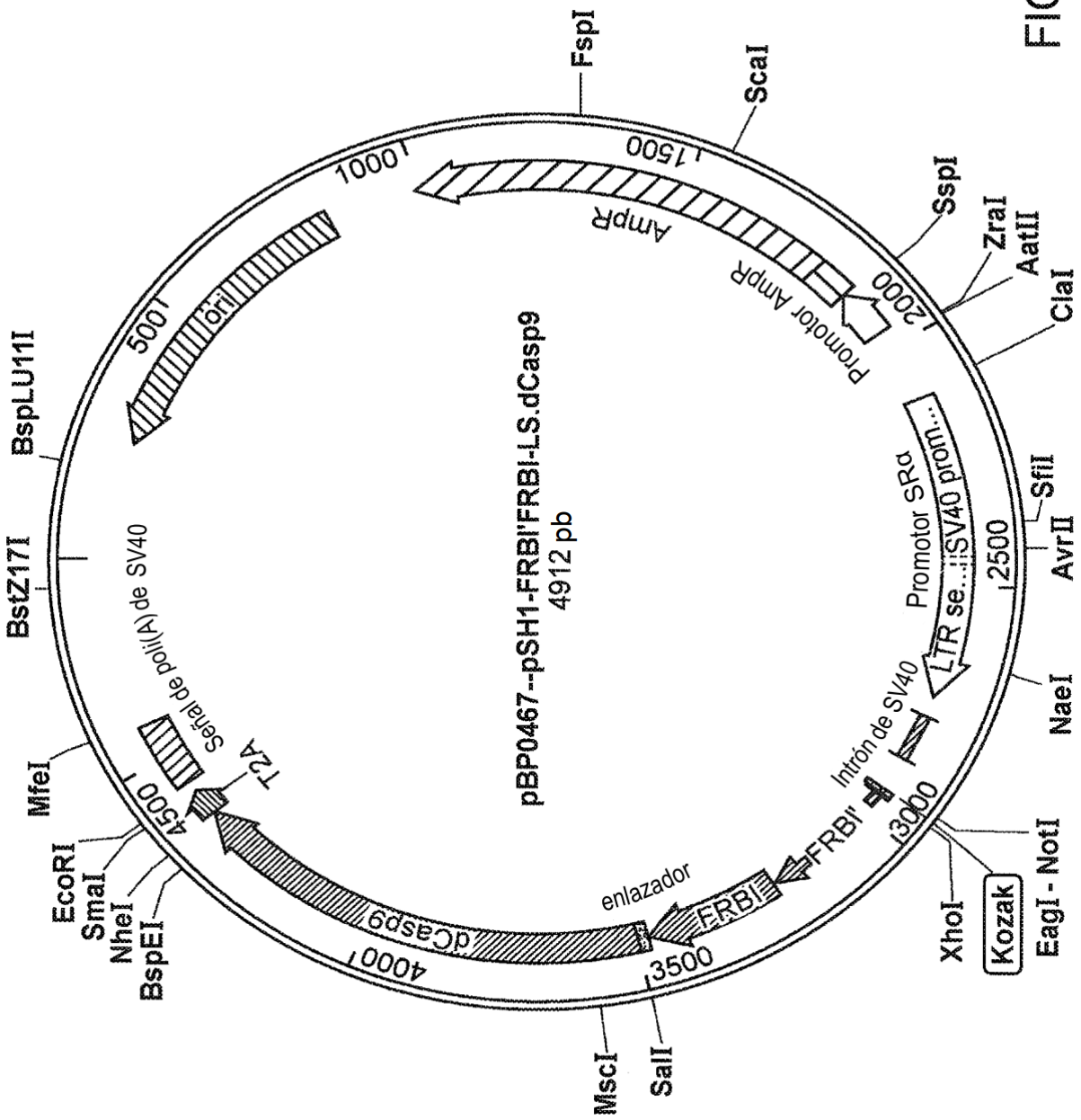

pBP0467--pSH1-FRBI'FRBI-LS.dCasp9
4912 pb
FspI
ScaI
SspI
ZraI
AatII
ClaI
SfiI
AvrII
NaeI
EagI - NotI
XhoI
Kozak
FRBI'
FRBI
enlazador
dCasp9
T2A
Señal de poli(A) de SV40
MfeI
EcoRI
SmaI
NheI
BspEI
MscI
SalI
BstZ17I
BspLU11I
ori
AmpR
Promotor AmpR
Promotor SRα
LTR se...iiSV40 prom...
Intrón de SV40
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500
4000
4500

FIG. 31

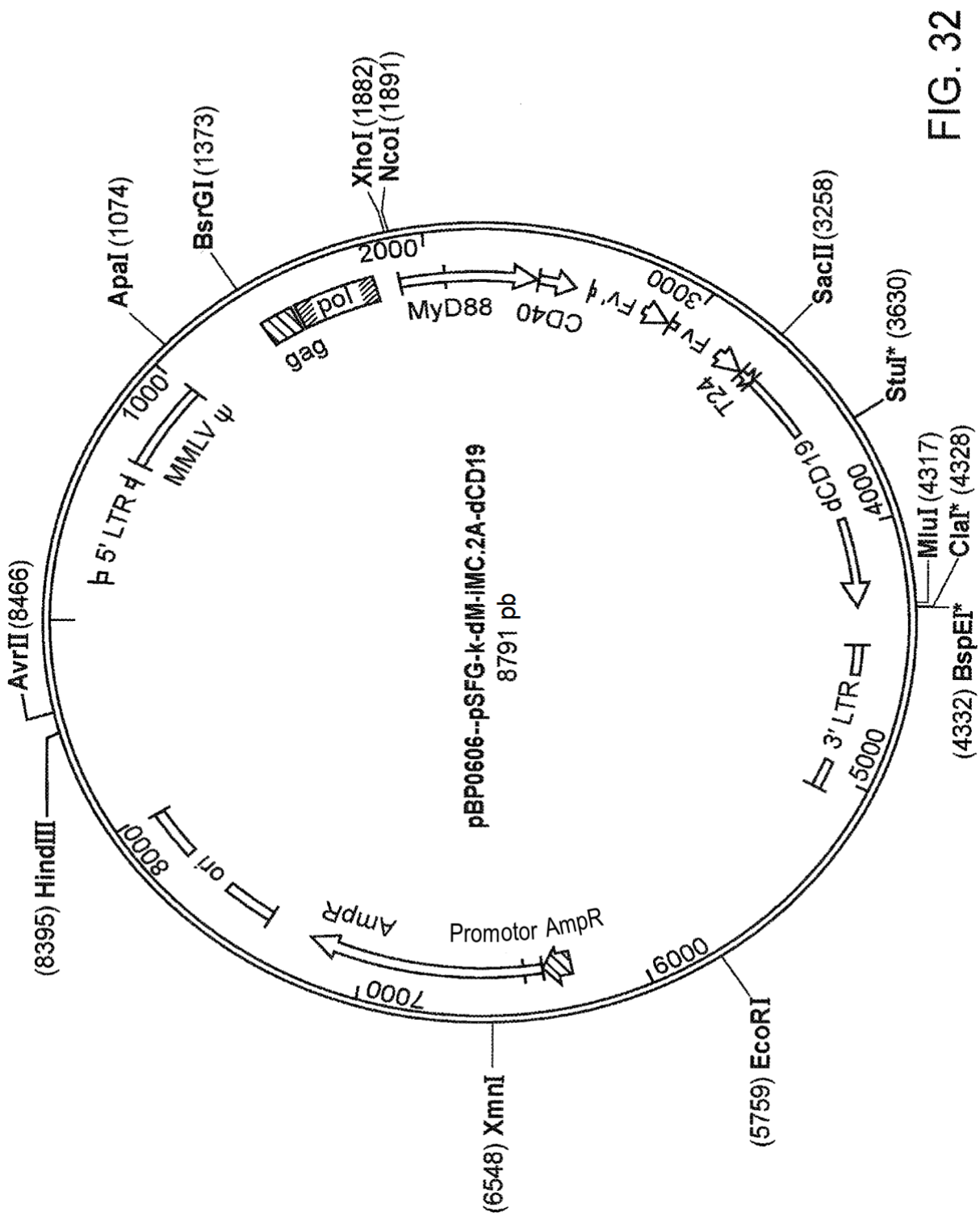

pBP0606--pSFG-k-dM-iMC.2A-dCD19
8791 pb
ApaI (1074)
BsrGI (1373)
XhoI (1882)
NcoI (1891)
SacII (3258)
StuI* (3630)
MluI (4317)
ClaI* (4328)
(4332) BspEI*
(5759) EcoRI
(6548) XmnI
(8395) HindIII
AvrII (8466)
5' LTR
MMLV ψ
gag
pol
MyD88
CD40
FV
T2A
dCD19
3' LTR
ori
AmpR
Promotor AmpR
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000

FIG. 32

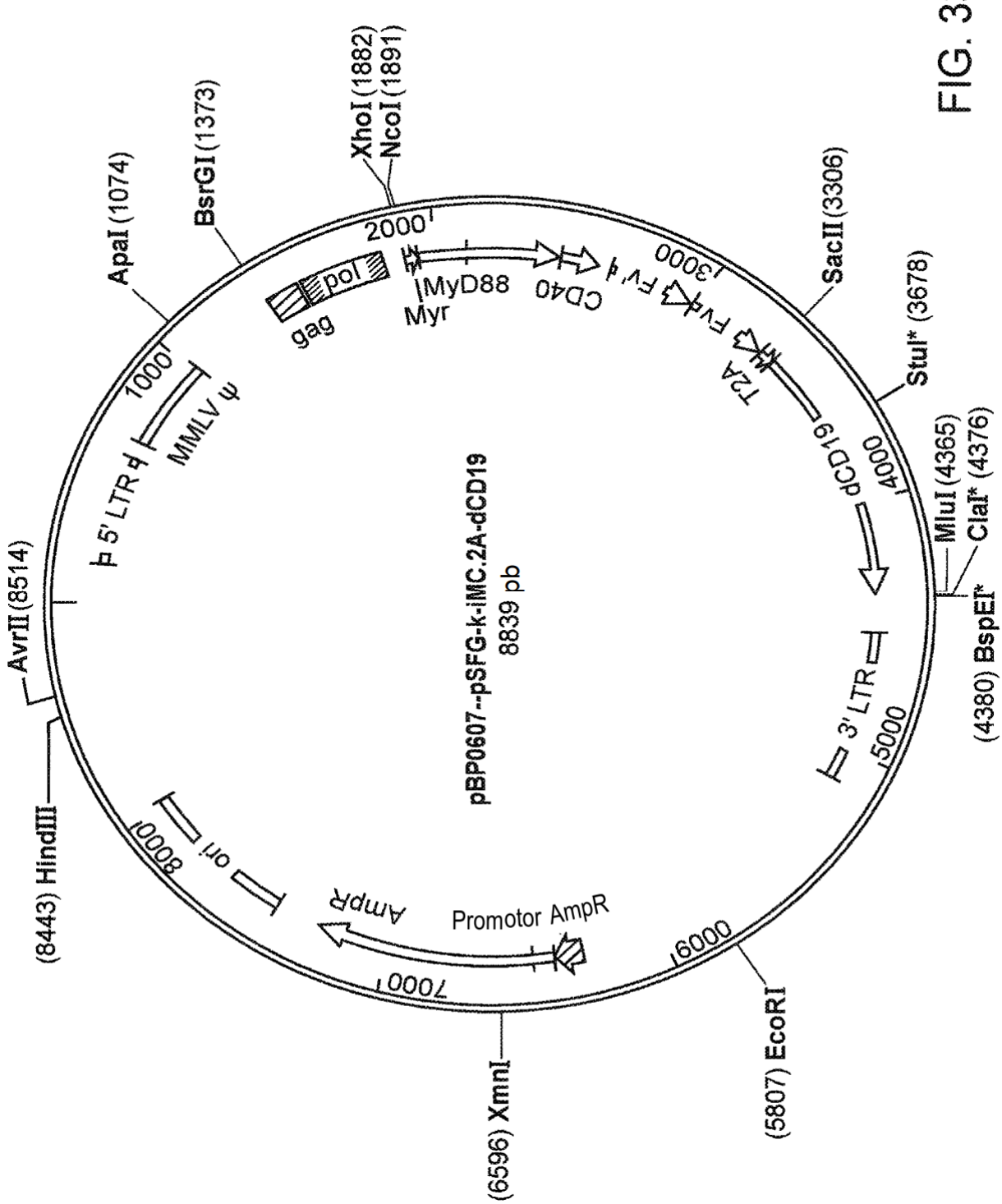

pBP0607--pSFG-k-iMC.2A-dCD19
8839 pb
XhoI (1882)
NcoI (1891)
BsrGI (1373)
ApaI (1074)
SacII (3306)
StuI* (3678)
MluI (4365)
ClaI* (4376)
(4380) BspEI*
AvrII (8514)
(8443) HindIII
(6596) XmnI
(5807) EcoRI
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000
1000
pol
gag
MyD88
Myr
CD40
FV
T2A
dCD19
3' LTR
5' LTR
MMLV ψ
ori
AmpR
Promotor AmpR

FIG. 33

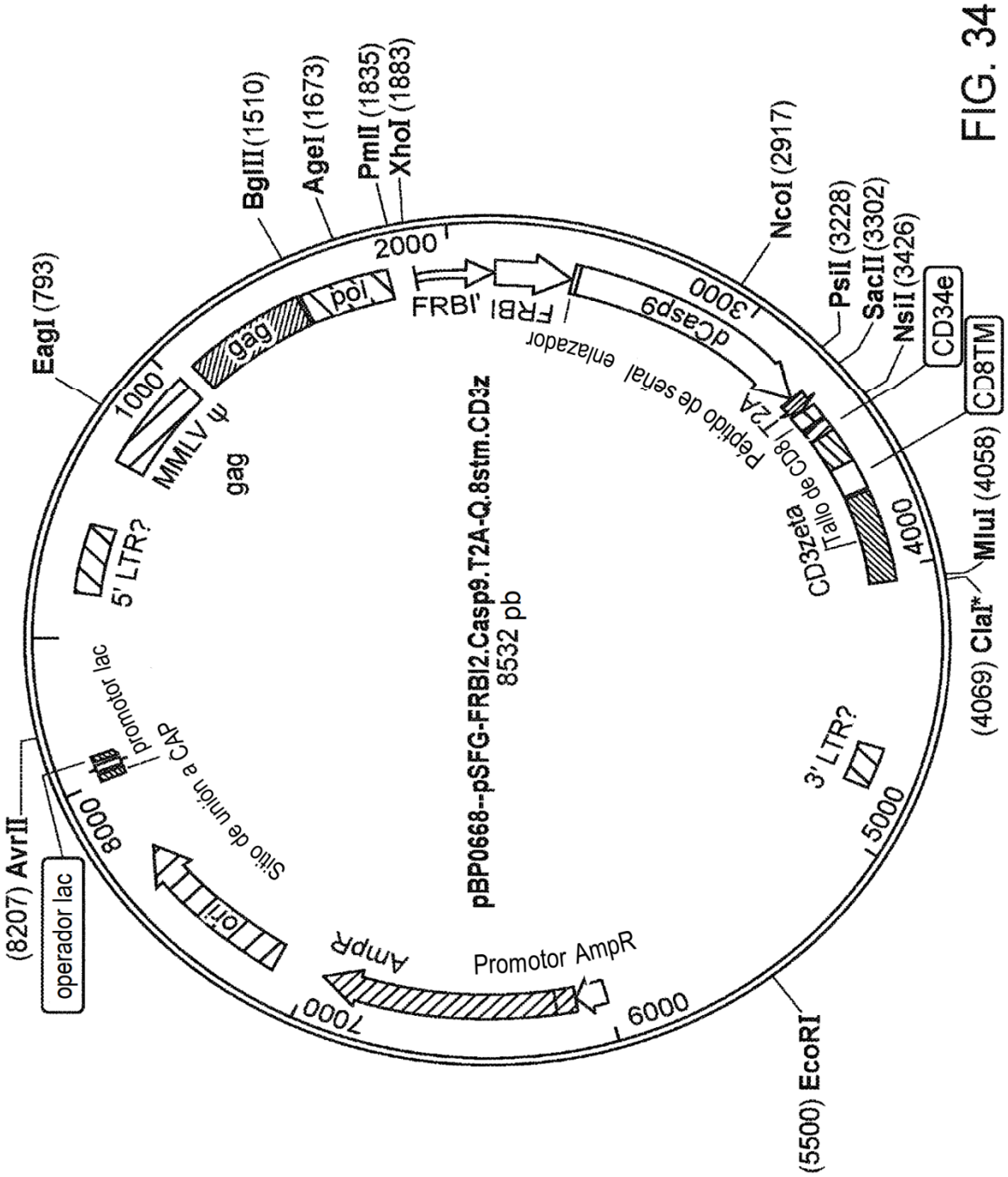

pBP0668--pSFG-FRBI2.Casp9.T2A-Q.8stm.CD3z
8532 pb
BglII (1510)
AgeI (1673)
PmlI (1835)
XhoI (1883)
NcoI (2917)
PsiI (3228)
SacII (3302)
NsiI (3426)
CD34e
CD8TM
MluI (4058)
ClaI* (4069)
EcoRI (5500)
AvrII (8207)
EagI (793)
gag
pol
FRBI'
FRBI
dCasp9
Péptido de señal
enlazador
T2A
CD3zeta
Tallo de CD8
5' LTR?
3' LTR?
MMLV Ψ
gag
promotor lac
CAP
Sitio de unión a
operador lac
Ori
AmpR
Promotor AmpR
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000

FIG. 34

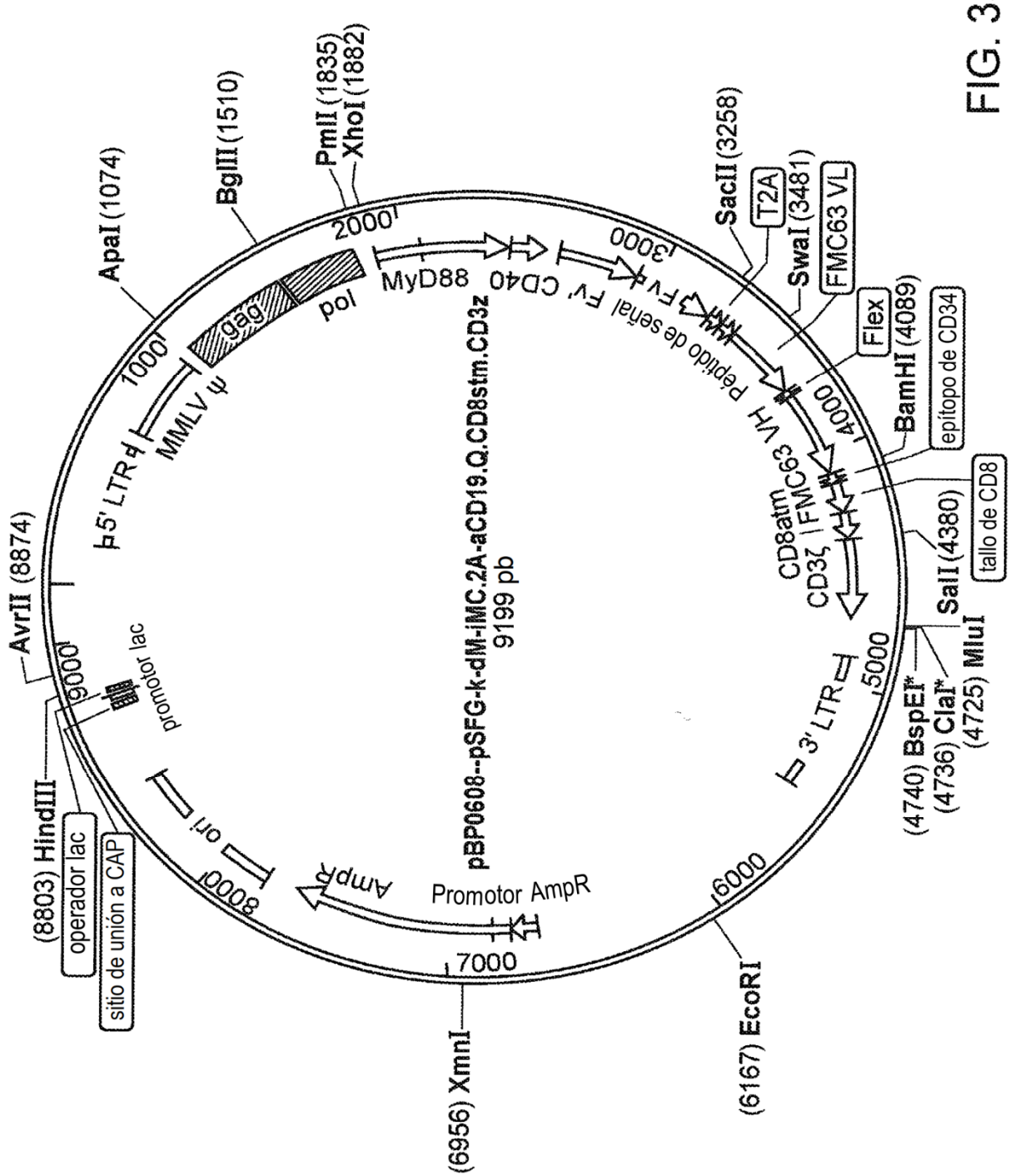

pBP0608--pSFG-k-dM-iMC.2A-aCD19.Q.CD8stm.CD3z
9199 pb
MyD88
CD40
FV'
Péptido de señal
VH
FMC63
CD8atm
CD3ζ
3' LTR
5' LTR
MMLV ψ
gag
pol
promotor lac
operador lac
sitio de unión a CAP
ori
AmpR
Promotor AmpR
T2A
FMC63 VL
Flex
epítopo de CD34
tallo de CD8
ApaI (1074)
BglII (1510)
PmlI (1835)
XhoI (1882)
SacII (3258)
SwaI (3481)
BamHI (4089)
SalI (4380)
MluI (4725)
(4740) BspEI*
(4736) ClaI*
(6167) EcoRI
(6956) XmnI
(8803) HindIII
AvrII (8874)
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000
9000

FIG. 35

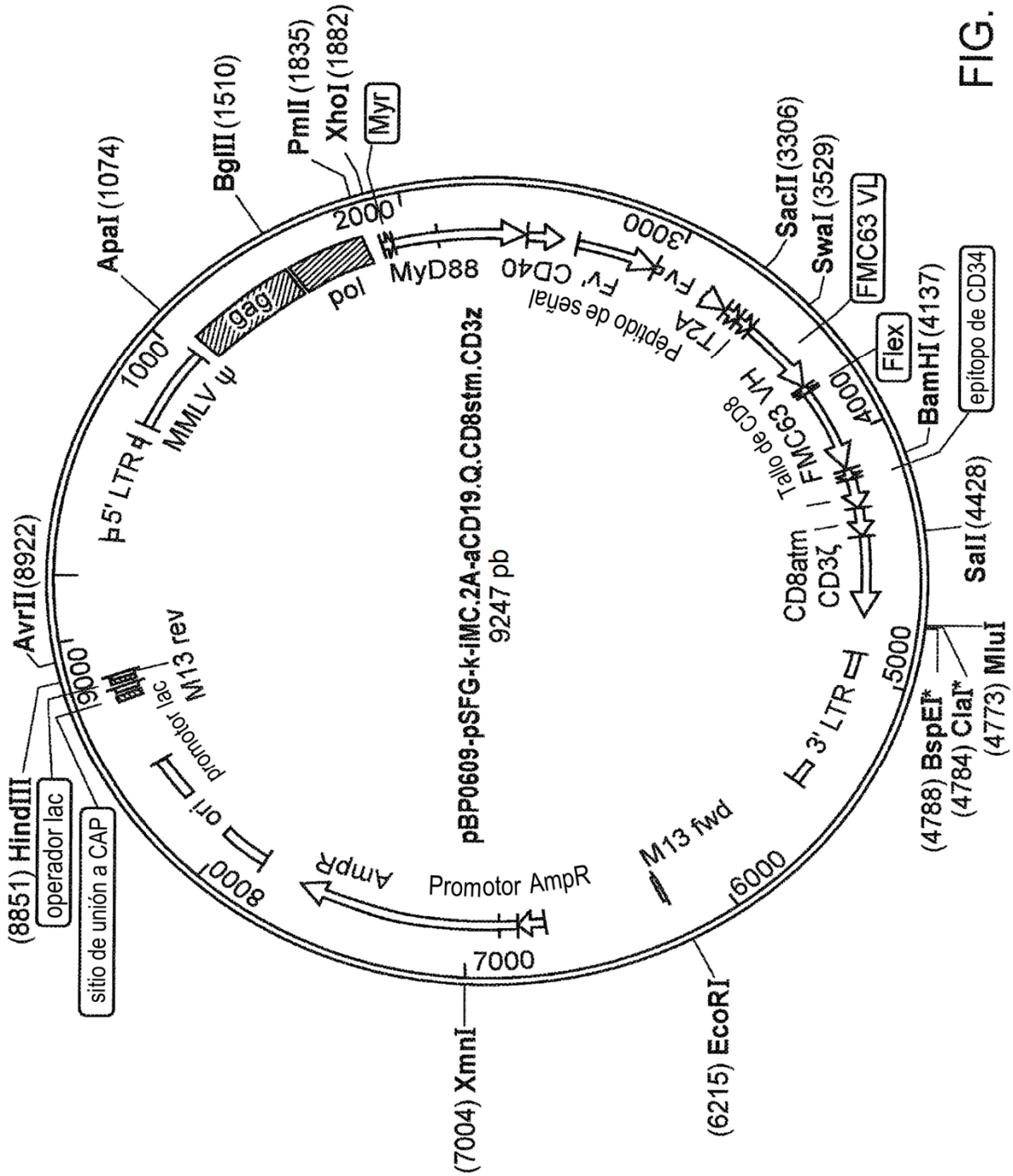

pBP0609-pSFG-k-iMC.2A-aCD19.Q.CD8stm.CD3z
9247 pb
ApaI (1074)
BglII (1510)
PmlI (1835)
XhoI (1882)
Myr
SacII (3306)
SwaI (3529)
FMC63 VL
Flex
BamHI (4137)
epítopo de CD34
SalI (4428)
MluI (4773)
ClaI* (4784)
BspEI* (4788)
3' LTR
M13 fwd
EcoRI (6215)
XmnI (7004)
Promotor AmpR
AmpR
ori
Promotor lac
M13 rev
operador lac
sitio de unión a CAP
HindIII (8851)
AvrII (8922)
5' LTR
MMLV ψ
gag
pol
MyD88
CD40
Fv'
Fv
T2A
Péptido de señal
Tallo de CD8
FMC63 VH
CD8atm
CD3ζ
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000
9000

FIG. 36

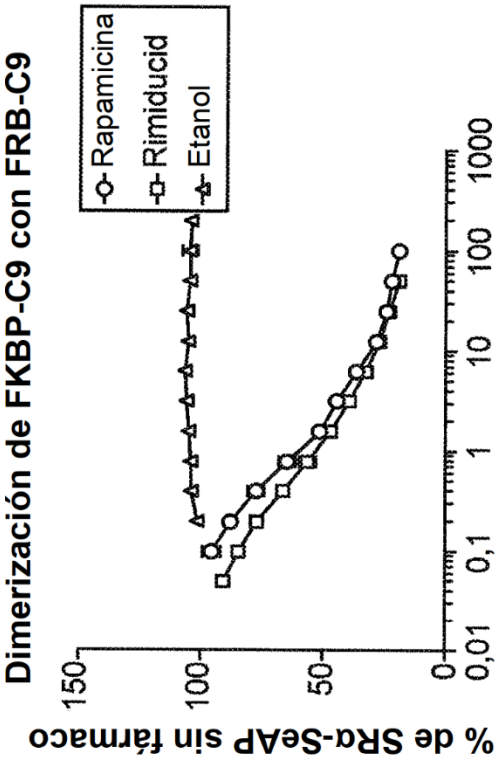


FIG. 37C

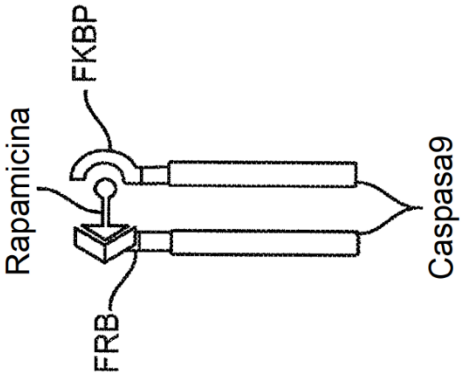


FIG. 37B

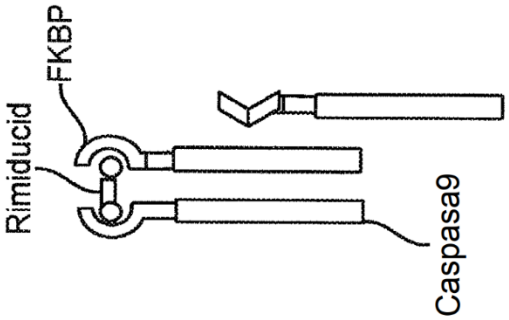


FIG. 37A

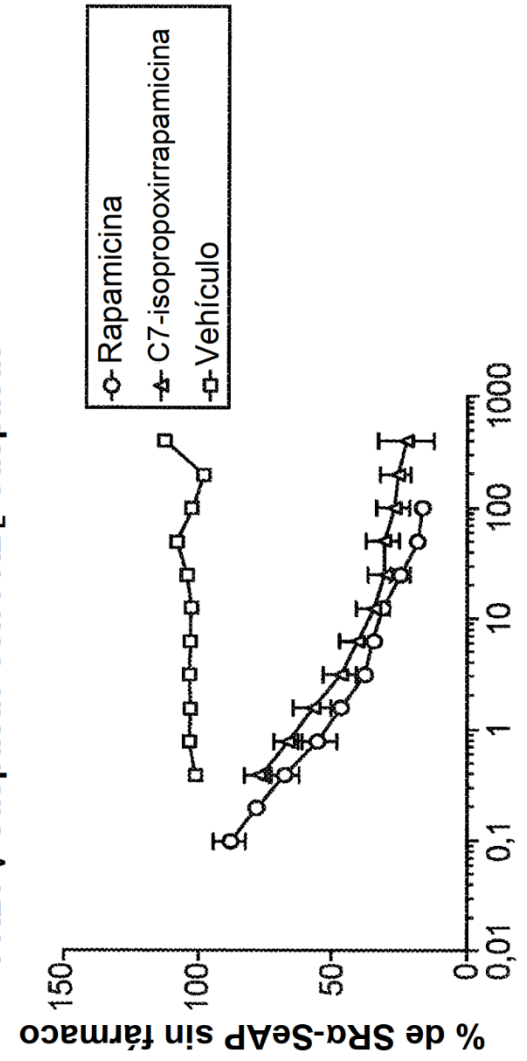


FIG. 38B

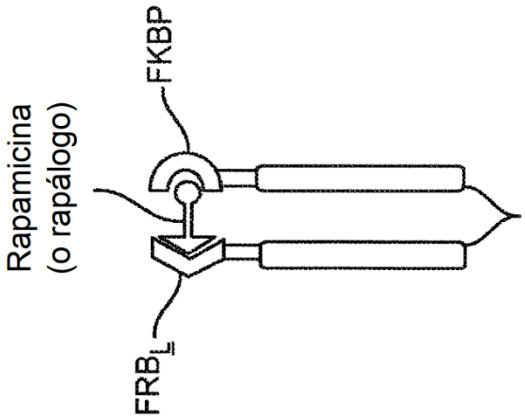


FIG. 38A

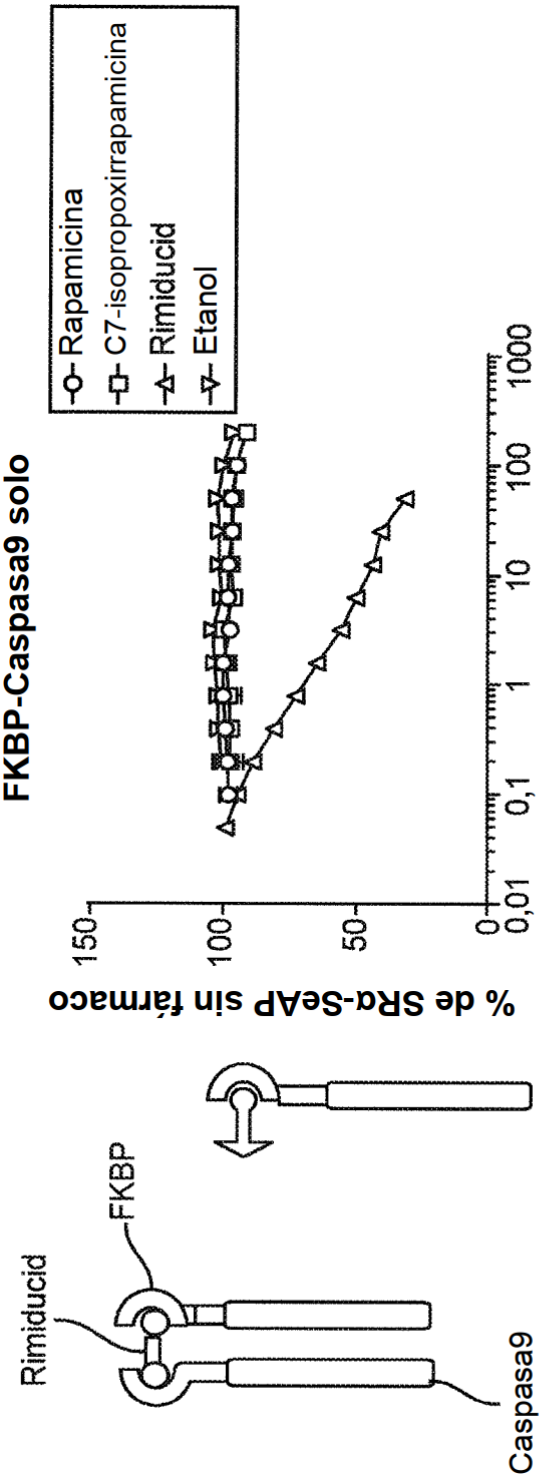


FIG. 39A

FIG. 39B

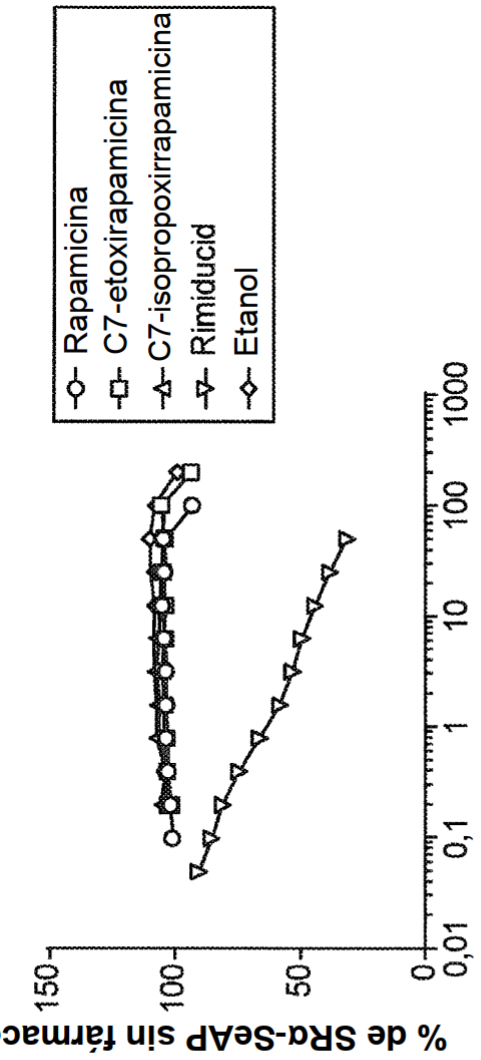


FIG. 40B

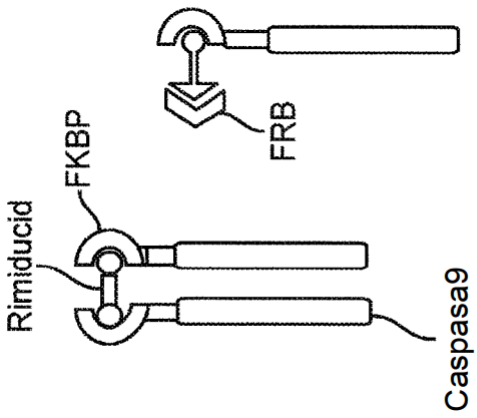


FIG. 40A

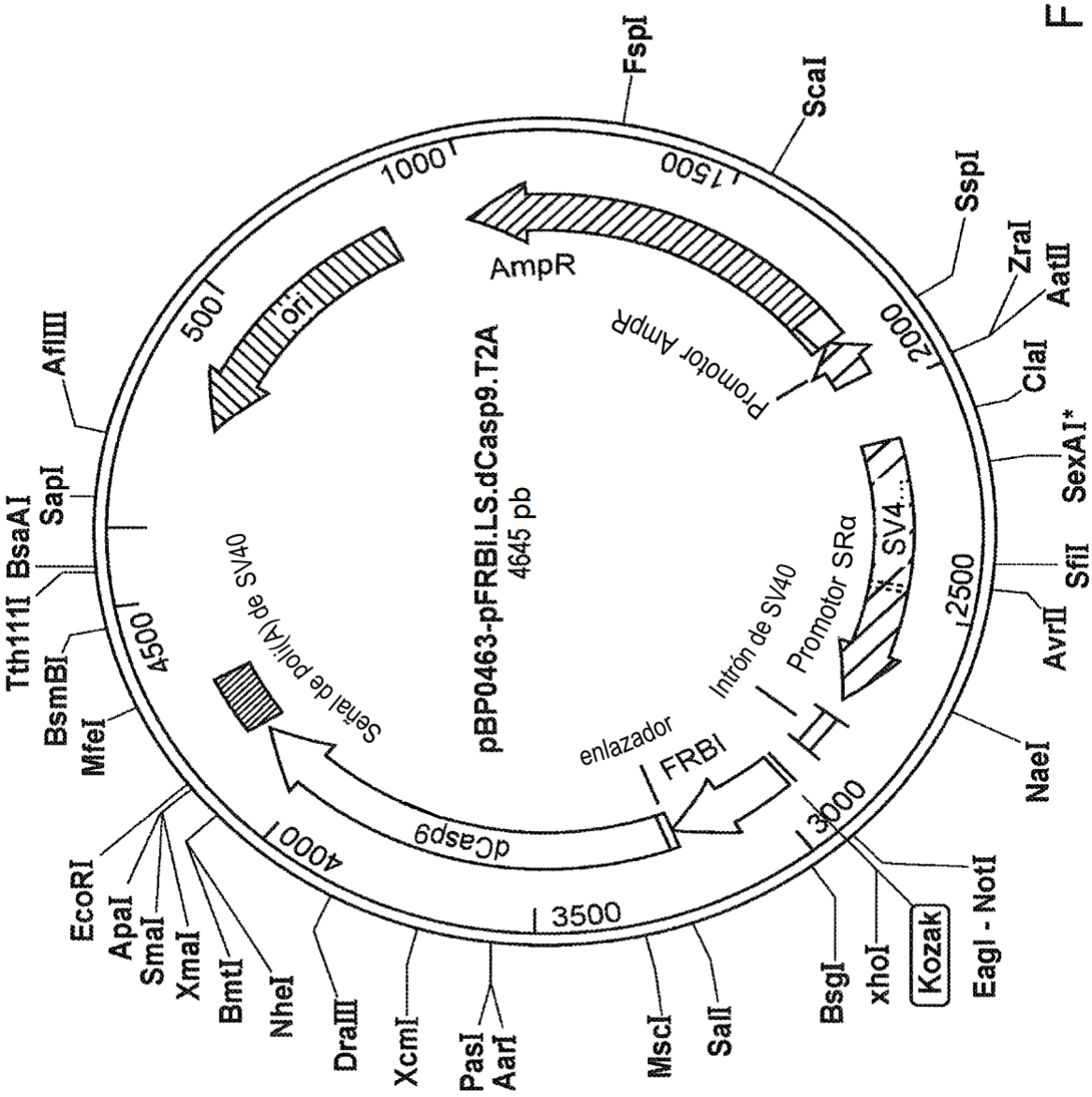

pBP0463-pFRBI.LS.dCasp9.T2A
4645 pb
AmpR
Promotor AmpR
ori
Intrón de SV40
Promotor SRα
SV4...
enlazador
FRBI
dCasp9
Señal de poli(A) de SV40
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500
4000
4500
FspI
ScaI
SspI
ZraI
AatII
ClaI
SexA1*
SfiI
AvrII
NaeI
EagI - NotI
Kozak
xhoI
BsgI
SalI
MscI
PasI
AarI
XcmI
DraIII
NheI
BmtI
XmaI
SmaI
ApaI
EcoRI
MfeI
BsmBI
Tth111I
BsaAI
SapI
AflIII

FIG. 41

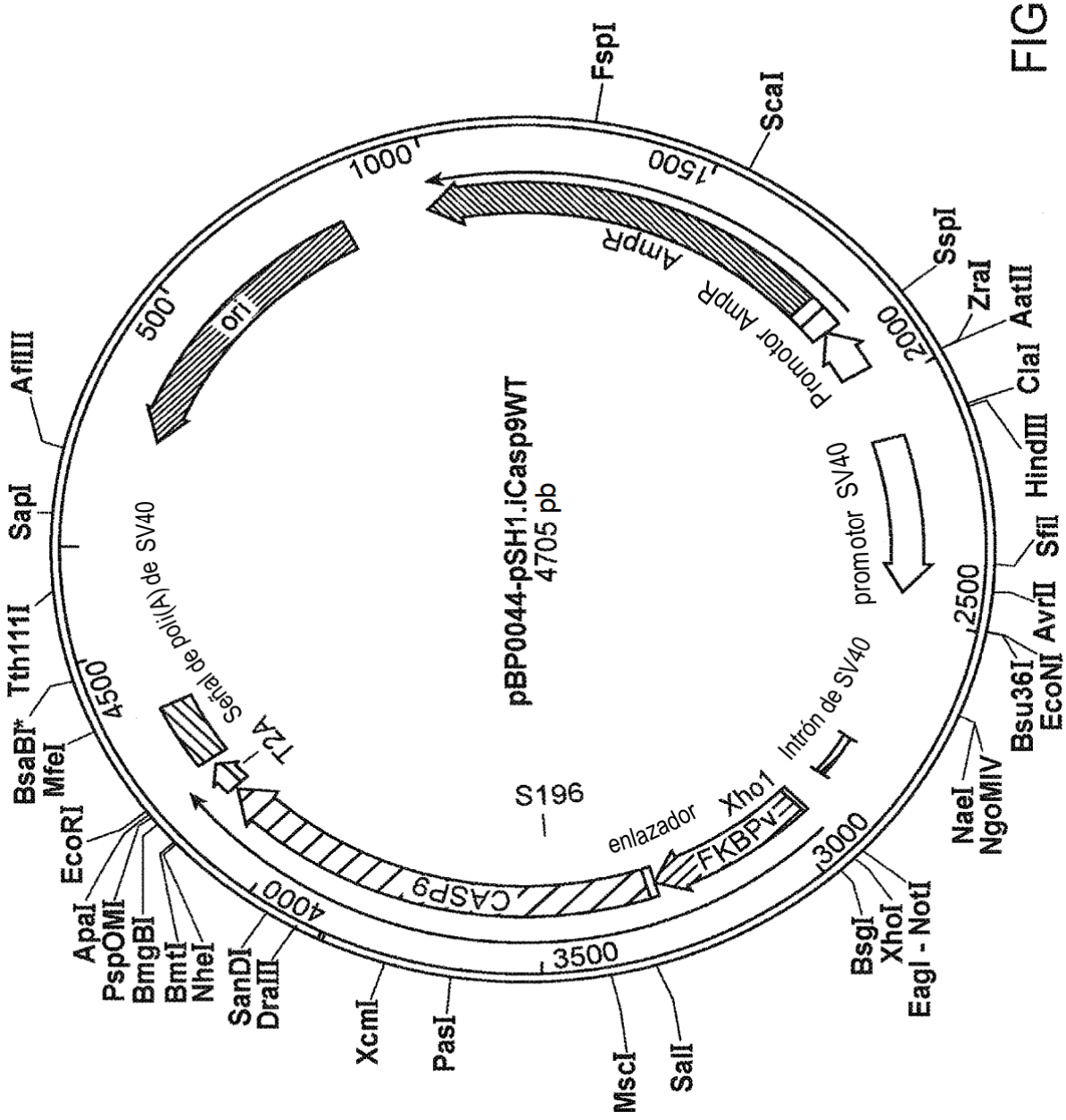

pBP0044-pSH1.iCasp9WT
4705 pb
ori
AmpR
Promotor AmpR
promotor SV40
Intrón de SV40
Señal de poli(A) de SV40
T2A
CASP9
enlazador
Xho1
FKBPv
S196
1000
1500
2000
2500
3000
3500
4000
4500
500
FspI
ScaI
SspI
ZraI
AatII
ClaI
HindIII
SfiI
AvrII
Bsu36I
EcoNI
NaeI
NgoMIV
BsgI
XhoI
EagI - NotI
SalI
MscI
PasI
XcmI
SanDI
DraIII
NheI
BmtI
BmgBI
PspOMI
ApaI
EcoRI
MfeI
BsaBI*
Tth111I
SapI
AflIII

FIG. 42

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citadas por el solicitante es para la conveniencia del lector solamente. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto gran cuidado para la recopilación de las referencias, no se puede excluir la existencia de errores u omisiones y la Oficina de Patentes Europea declina toda responsabilidad al respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 6187757 B **[0082]**
- US 93057215 A **[0131]**
- US 62130884 A **[0131]**
- US 5925565 A **[0199]**
- US 5935819 A **[0199]**
- US 5384253 A **[0229]**
- EP 0273085 A, Myers **[0236]**
- US 5550318 A **[0238]**
- US 5538880 A **[0238]**
- US 5610042 A **[0238]**
- WO 9409699 A **[0238]**
- US 21003414 A **[0508]**
- US 11273911 A **[0508]**
- US 9089520 B **[0508]**
- US 62201814 A **[0508]**
- US 79213513 A **[0508]**
- US 29640414 A **[0508]**
- US 62044885 A **[0508]**
- US 84271015 A **[0508]**
- US 64055415 A **[0508]**
- US 7404950 B, Spencer, D. **[0508]**
- US 44593910 A, Spencer, D. **[0508]**
- US 56399109 A, Spencer, D. **[0508]**
- US 13087329 B, Slawin, K. **[0508]**
- US 13763591 B, Spencer, D. **[0508]**
- US 2014022004 W **[0508]**

Literatura no patente citada en la descripción

- **SPENCER DM et al.** *Science,* vol. 262 (93), 1019-24 **[0048]**
- **HO SN et al.** *Nature,* vol. 382 (96), 822-6 **[0048]**
- **CHEN J et al.** *PNAS,* vol. 92 (95), 4947-51 **[0050] [0503]**
- **LIBERLES SD.** *PNAS,* vol. 94 (97), 7825-30 **[0050] [0503]**
- **RIVERA VM.** *Nat Med,* vol. 2 (96), 1028-1032 **[0050]**
- **STANKUNAS K.** *Mol Cell,* vol. 12 (03), 1615-24 **[0050] [0053]**
- **BAYLE JH.** *Chem & Biol,* vol. 13 (06), 99-107 **[0050] [0503]**
- **STANKUNAS K.** *ChemBioChem,* vol. 8 (07), 1162-69 **[0053]**
- **LUENGO JI.** *Chem & Biol,* vol. 2 (95), 471-81 **[0082] [0509]**
- **LUENGO JI.** *J. Org Chem,* vol. 59 (94), 6512-6513 **[0082]**
- **LIBERLES S.** *PNAS,* vol. 94 (97), 7825-30 **[0082] [0083]**
- **BAYLE.** *Chem & Bio.,* vol. 13 (06), 99-107 **[0082]**
- **BAYLE et al.** *Chem & Bio,* vol. 13 (06), 99-107 **[0083]**
- **STANKUNAS et al.** *Chembiochem,* vol. 8 (07), 1162-1169 **[0083]**
- **HAYNES, N.M. et al.** *J. Immunol.,* 2001, vol. 166, 182-7 **[0112]**
- **PITTENGER, M. F. et al.** *Science,* 1999, vol. 284, 143-147 **[0118]**
- **DOMINICI, M. et al.** *Cytotherapy,* 2006, vol. 8, 315-317 **[0118]**
- **PROCKOP, D. J.** *Science,* 1997, vol. 276, 71-74 **[0118]**
- **LEE, R. H. et al.** *Proc Natl Acad Sci U S A,* 2006, vol. 103, 17438-17443 **[0118]**
- **STUDENY, M. et al.** *Cancer Res,* 2002, vol. 62, 3603-3608 **[0118]**
- **STUDENY, M. et al.** *J Natl Cancer Inst,* 2004, vol. 96, 1593-1603 **[0118]**
- **HORWITZ, E. M. et al.** *Nat Med,* 1999, vol. 5, 309-313 **[0118]**
- **CHAMBERLAIN, G. et al.** *Stem Cells,* 2007, vol. 25, 2739-2749 **[0118]**
- **PHINNEY, D. G. ; PROCKOP, D. J.** *Stem Cells,* 2007, vol. 25, 2896-2902 **[0118]**
- **HORWITZ, E. M. et al.** *Proc Natl Acad Sci U S A,* 2002, vol. 99, 8932-8937 **[0118]**
- **HALL, B. et al.** *Int J Hematol,* 2007, vol. 86, 8-16 **[0118]**
- **NAUTA, A. J. ; FIBBE, W. E.** *Blood,* 2007, vol. 110, 3499-3506 **[0118]**
- **LE BLANC, K. et al.** *Lancet,* 2008, vol. 371, 1579-1586 **[0118]**
- **TYNDALL, A. ; UCCELLI, A.** *Bone Marrow Transplant,* 2009 **[0118]**
- **HORWITZ, E. M. et al.** *Biol Blood Marrow Transplant,* 2007, vol. 13, 53-57 **[0119]**
- **TOLAR, J. et al.** *Stem Cells,* 2007, vol. 25, 371-379 **[0119]**
- **YOON, Y.-S. et al.** *Circulation,* 2004, vol. 109, 3154-3157 **[0119]**
- **BREITBACH, M. et al.** *Blood,* 2007, vol. 110, 1362-1369 **[0119]**
- **CHANG, M. G. et al.** *Circulation,* 2006, vol. 113, 1832-1841 **[0119]**

- **SALE, G. E. ; STORB, R.** *Exp Hematol,* 1983, vol. 11, 961-966 **[0119]**
- **ZHONG, X.-S.** *Molecular Therapy,* 2010, vol. 18, 413-420 **[0120]**
- **MORGAN, R.A. et al.** *Molecular Therapy,* 2010, vol. 18, 843-851 **[0121]**
- **TILL BG ; JENSEN MC ; WANG J et al.** CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: pilot clinical trial results. *Blood,* 2012, vol. 119, 3940-50 **[0122] [0492]**
- **PULE MA ; SAVOLDO B ; MYERS GD et al.** Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. *Nat Med,* 2008, vol. 14, 1264-70 **[0122] [0492]**
- **KERSHAW MH ; WESTWOOD JA ; PARKER LL et al.** A phase 1 study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. *Clin Cancer Res,* 2006, vol. 12, 6106-15 **[0122] [0492]**
- **CARPENITO C ; MILONE MC ; HASSAN R et al.** Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 2009, vol. 106, 3360-5 **[0122] [0492]**
- **SONG DG ; YE Q ; POUSSIN M et al.** CD27 costimulation augments the survival and antitumor activity of redirected human T cells in vivo. *Blood,* 2012, vol. 119, 696-706 **[0122] [0492]**
- **KALOS M ; LEVINE BL ; PORTER DL et al.** T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med,* 2011, vol. 3, 95ra73 **[0122] [0492]**
- **PORTER DL ; LEVINE BL ; KALOS M et al.** Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med,* 2011, vol. 365, 725-33 **[0122] [0492]**
- **BRENTJENS RJ ; DAVILA ML ; RIVIERE I et al.** CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med,* 2013, vol. 5, 177ra38 **[0122]**
- **FINNEY HM ; AKBAR AN ; LAWSON AD.** Activation of resting human primary T cells with chimeric receptors: costimulation from CD28, inducible costimulator, CD134, and CD137 in series with signals from the TCR zeta chain. *J Immunol,* 2004, vol. 172, 104-13 **[0123] [0492]**
- **GUEDAN S ; CHEN X ; MADAR A et al.** ICOS-based chimeric antigen receptors program bipolar TH17/TH1 cells. *Blood,* 2014 **[0123] [0492]**
- **GROSS, G. ; ESHAR, Z.** *FASEB Journal,* 1992, vol. 6, 3370-3378 **[0124]**
- **ZHANG, Y. et al.** *PLOS Pathogens,* 2010, vol. 6, 1-13 **[0124]**
- **ZHONG XS et al.** *Mol Ther.,* February 2010, vol. 18 (2), 413-20 **[0128]**
- **MILONE, M.C. et al.** *Mol. Ther.,* 2009, vol. 17, 1453-1464 **[0128]**
- **KALOS, M. et al.** *Sci. Transl. Med.,* 2011, vol. 3, 95ra73 **[0128]**
- **PORTER, D. et al.** *N. Engl. J. Med.,* 2011, vol. 365, 725-533 **[0128]**
- **GIUDICELLI, V. et al.** IMGT/LIGM-DB, the IMGT® comprehensive database of immunoglobulin and T cell receptor nucleotide sequences. *Nucl. Acids Res.,* 2006, vol. 34, D781-D784 **[0130]**
- **LEFRANC ; LEFRANC.** PMID: 16381979;T cell Receptor Factsbook. Academic Press **[0130]**
- **BOLLARD, C.J. et al.** *Blood,* 2002, vol. 99, 3179-3187 **[0132]**
- **BOLLARD, C.M. et al.** *J. Exptl. Med.,* 2004, vol. 200, 1623-1633 **[0132]**
- **BARBER, A. et al.** *Cancer Res,* 2007, vol. 67, 5003-8 **[0133]**
- **BARBER A et al.** *Exp Hematol.,* 2008, vol. 36, 1318-28 **[0133]**
- **ZHANG T. et al.** *Cancer Res.,* 2007, vol. 67, 11029-36 **[0133]**
- **HURLEY CK et al.** *Biol Blood Marrow Transplant,* 2003, vol. 9, 610-615 **[0138]**
- **DEY BR et al.** *Br.J Haematol.,* 2006, vol. 135, 423-437 **[0138]**
- **AVERSA F et al.** *N Engl J Med,* 1998, vol. 339, 1186-1193 **[0138]**
- **AVERSA F et al.** *J C lin.On col.,* 2005, vol. 23, 3447-3454 **[0138]**
- **LANG P.** *Mol.Dis.,* 2004, vol. 33, 281-287 **[0138]**
- **KOLB HJ et al.** *Blood,* 2004, vol. 103, 767-776 **[0138]**
- **GOTTSCHALK S et al.** *Annu.Rev.Med,* 2005, vol. 56, 29-44 **[0138]**
- **BLEAKLEY M et al.** *Nat.Rev.Cancer,* 2004, vol. 4, 371-380 **[0138]**
- **ANDRE-SCHMUTZ I et al.** *Lancet,* 2002, vol. 360, 130-137 **[0138]**
- **SOLOMON SR et al.** *Blood,* 2005, vol. 106, 1123-1129 **[0138]**
- **AMROLIA PJ et al.** *Blood,* 2006, vol. 108, 1797-1808 **[0138]**
- **AMROLIA PJ et al.** *Blood,* 2003 **[0138]**
- **GHETIE V et al.** *J Immunol Methods,* 1991, vol. 142, 223-230 **[0138]**
- **MOLLDREM JJ et al.** *Cancer Res,* 1999, vol. 59, 2675-2681 **[0138]**
- **REZVANI K et al.** *Clin.Cancer Res.,* 2005, vol. 1 (1), 8799-8807 **[0138]**
- **REZVANI K et al.** *Blood,* 2003, vol. 102, 2892-2900 **[0138]**
- **PRZEPIORKA D et al.** *Consensus Conference on Acute GVHD Grading. Bone Marrow Transplant,* 1994, vol. 1995 (15), 825-828 **[0141]**
- **CLACKSON T et al.** *Proc Natl Acad Sci USA.,* 1998, vol. 95, 10437-10442 **[0143]**
- **LULIUCCI JD et al.** *J Clin Pharmacol.,* 2001, vol. 41, 870-879 **[0143]**

- **THOMIS DC et al.** *Blood*, 2001, vol. 97, 1249-1257 **[0143]**
- **SPENCER DM et al.** *Curr Biol.*, 1996, vol. 6, 839-847 **[0143]**
- **FAN L et al.** *Hum Gene Ther.*, 1999, vol. 10, 2273-2285 **[0143]**
- **BERGER C et al.** *Blood*, 2004, vol. 103, 1261-1269 **[0143]**
- **JUNKER K et al.** *Gene Ther.*, 2003, vol. 10, 1189-197 **[0143]**
- **AMARA JF.** *PNAS*, vol. 94 (97), 10618-23 **[0143]**
- **BOLLARD CM et al.** *Blood*, 2002, vol. 99, 3179-3187 **[0145]**
- **WAGNER HJ et al.** *Cancer Gene Ther*, 2004, vol. 11, 81-91 **[0145]**
- **PULE M et al.** *Cytotherapy*, 2003, vol. 5, 211-226 **[0145]**
- **SCHUMACHER TN.** *Nat Rev Immunol*, 2002, vol. 2, 512-519 **[0145]**
- **STRAATHOF, K.C. et al.** *Blood*, 2005, vol. 105, 4248-54 **[0145]**
- **MACCORKLE, R.A. et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1998, vol. 95, 3655-3660 **[0147]**
- **FAN, L. et al.** *Human Gene Therapy*, 1999, vol. 10, 2273-2285 **[0147]**
- **KOPYTEK, S.J. et al.** *Chemistry & Biology*, 2000, vol. 7, 313-321 **[0156]**
- **GESTWICKI, J.E. et al.** *Combinatorial Chem. & High Throughput Screening*, 2007, vol. 10, 667-675 **[0156]**
- **CLACKSON T.** *Chem Biol Drug Des*, 2006, vol. 67, 440-2 **[0156]**
- **CLACKSON, T. et al.** Chemical Biology: From Small Molecules to Systems Biology and Drug Design. Wiley, 2007 **[0156]**
- **SPENCER, D. M. et al.** *Science*, 1993, vol. 262, 1019-1024 **[0163]**
- **SPENCER D. M. et al.** *Curr Biol*, 1996, vol. 6, 839-847 **[0163]**
- **BLAU, C. A. et al.** *Proc Natl Acad.Sci. USA*, 1997, vol. 94, 3076-3081 **[0163]**
- **LUO, Z. et al.** *Nature*, 1996, vol. 383, 181-185 **[0163]**
- **MACCORKLE, R. A. et al.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, vol. 95, 3655-3660 **[0163]**
- **HO, S. N. et al.** *Nature*, 1996, vol. 382, 822-826 **[0163]**
- **RIVERA, V. M. et al.** *Nat.Med.*, 1996, vol. 2, 1028-1032 **[0163]**
- **SPENCER D. M. et al.** *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 1995, vol. 92, 9805-9809 **[0163]**
- **HOLSINGER, L. J. et al.** *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 1995, vol. 95, 9810-9814 **[0163]**
- **JEMAL, A. et al.** *CA Cancer J. Clinic.*, 2008, vol. 58, 71-96 **[0166]**
- **SCHER, H.I. ; KELLY, W.K.** *Journal of Clinical Oncology*, 1993, vol. 11, 1566-72 **[0166]**
- **SCHELLHAMMER, P.F. et al.** *J. Urol.*, 1997, vol. 157, 1731-5 **[0167]**
- *CHEMICAL ABSTRACTS*, 195514-63-7 **[0168]**
- **FARRAR, M. A.** *Nature*, 1996, vol. 383, 178-181 **[0169]**
- **LIANG FS et al.** *Sci Signal.*, 15 March 2011, vol. 4 (164), rs2 **[0169]**
- **GAUTHIER-CAMPBELL et al.** *Molecular Biology of the Cell*, 2004, vol. 15, 2205-2217 **[0170]**
- **GLABATI et al.** *Biochem. J.*, 1994, vol. 303, 697-700 **[0170]**
- **ZLAKINE et al.** *J. Cell Science*, 1997, vol. 110, 673-679 **[0170]**
- *Chemical Reviews*, vol. 71 (6), 599 **[0171]**
- **KLOOSTER JP et al.** *Biology of the Cell*, 2007, vol. 99, 1-12 **[0173]**
- **VINCENT, S. et al.** *Nature Biotechnology*, 2003, vol. 21 (1098), 936-40 **[0173]**
- **LULIUCCI JD et al.** *J Clin Pharmacol*, 2001, vol. 41, 870-9 **[0179]**
- **GOSSEN ; BUJARD.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 5547-5551 **[0189]**
- **GOSSEN et al.** *Science*, 1995, vol. 268, 1766-1769 **[0189]**
- **DONNELLY, J.J. et al.** *Annu. Rev. Immunol.*, 1997, vol. 15, 617-48 **[0190]**
- **BOJAK, A. et al.** *Vaccine*, 2002, vol. 20, 1975-79 **[0192]**
- **CAZEAUX., N. et al.** *Vaccine*, 2002, vol. 20, 3322-31 **[0192]**
- **KAGEYAMA et al.** *J. Biol. Chem.*, 1987, vol. 262, 2345-2351 **[0194]**
- **ARCONE et al.** *Nucl. Acids Res.*, 1988, vol. 16 (8), 3195-3207 **[0194]**
- **OLIVIERO et al.** *EMBO J.*, 1987, vol. 6, 1905-1912 **[0194]**
- **POLI ; CORTESE.** *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 8202-8206 **[0194]**
- **WILSON et al.** *Mol. Cell. Biol.*, 1990, 6181-6191 **[0194]**
- **PROWSE ; BAUMANN.** *Mol Cell Biol*, 1988, vol. 8, 42-51 **[0194]**
- **ZECHNER et al.** *Mol. Cell. Biol.*, 1988, 2394-2401 **[0194]**
- **RON et al.** *Mol. Cell. Biol.*, 1991, 2887-2895 **[0194]**
- **KUTZLER, M.A. ; WEINER, D.B.** *Nature Reviews Genetics*, 2008, vol. 9, 776-88 **[0196]**
- **MONTGOMERY, D.L. et al.** *DNA Cell Biol*, 1993, vol. 12, 777-83 **[0197]**
- **KUTZLER, M.A. ; WEINER, D.B.** *Nature Rev. Gen.*, 2008, vol. 9, 776-88 **[0197] [0200] [0201] [0202]**
- **PELLETIER ; SONENBERG.** *Nature*, 1988, vol. 334, 320-325 **[0199]**
- **MACEJAK ; SARNOW.** *Nature*, 1991, vol. 353, 90-94 **[0199]**
- **YAN, J. et al.** *Mol. Ther.*, 2007, vol. 15, 411-21 **[0200]**
- **CHEUNG, Y.K. et al.** *Vaccine*, 2004, vol. 23, 629-38 **[0200]**
- **YADAVA, A. ; OCKENHOUSE, C.F.** *Infect. Immun.*, 2003, vol. 71, 4962-69 **[0200]**

- **SMITH., J.M. et al.** *AIDS Res. Hum. Retroviruses,* 2004, vol. 20, 1335-47 **[0200]**
- **ZHOU, W. et al.** *Vet. Microbiol.,* 2002, vol. 88, 127-51 **[0200]**
- **WU, X. et al.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* 2004, vol. 313, 89-96 **[0200]**
- **ZHANG, W. et al.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* 2006, vol. 349, 69-78 **[0200]**
- **DEML, L.A. et al.** *J. Virol.,* 2001, vol. 75, 1099-11001 **[0200]**
- **SCHNEIDER, R. M. et al.** *J. Virol.,* 1997, vol. 71, 4892-4903 **[0200]**
- **WANG, S.D. et al.** *Vaccine,* 2006, vol. 24, 4531-40 **[0200]**
- **MEGEDE, J. et al.** *J. Virol.,* 2000, vol. 74, 2628-2635 **[0200]**
- **LI, V. et al.** *Virology,* 2000, vol. 272, 417-28 **[0201]**
- **XU, Z.L. et al.** *Gene,* 2001, vol. 272, 149-56 **[0201]**
- **MALIN, A.S. et al.** *Microbes Infect.,* 2000, vol. 2, 1677-85 **[0201]**
- **KUTZLER, M.A. et al.** *J. Immunol.,* 2005, vol. 175, 112-125 **[0201]**
- **YANG, J.S. ; 2002 et al.** *Emerg. Infect. Dis.,* vol. 8, 1379-84 **[0201]**
- **KUMAR., S. et al.** *DNA Cell Biol.,* 2006, vol. 25, 383-92 **[0201]**
- **WANG, S. et al.** *Vaccine,* 2006, vol. 24, 4531-40 **[0201]**
- **TEPLER, I et al.** *J. Biol. Chem.,* 1989, vol. 264, 5912 **[0201]**
- **LADDY, D.J. et al.** *PLoS.ONE,* 2008, vol. 3, e2517 **[0202]**
- **GAUBERT, G. ; WENGEL, J.** *Tetrahedron Letters,* 2004, vol. 45, 5629 **[0212]**
- **SCHWEITZER et al.** *J. Org. Chem.,* 1994, vol. 59, 7238-7242 **[0213]**
- **WILSON et al.** *Science,* 1989, vol. 244, 1344-1346 **[0227]**
- **NABEL et al.** *Science,* 1989, vol. 244 (4910), 1342-1344 **[0227]**
- **POTTER et al.** *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA,* 1984, vol. 81, 7161-7165 **[0230]**
- **TUR-KASPA et al.** *Mol. Cell Biol.,* 1986, vol. 6, 716-718 **[0230]**
- **SARDESAI, N.Y. ; WEINER, D.B.** *Current Opinion in Immunotherapy,* 2011, vol. 23, 421-9 **[0231]**
- **FERRARO, B. et al.** *Human Vaccines,* 2011, vol. 7, 120-127 **[0231]**
- **GRAHAM ; VAN DER EB.** *Virology,* 1973, vol. 52, 456-467 **[0232]**
- **CHEN ; OKAYAMA.** *Mol. Cell Biol.,* 1987, vol. 7 (8), 2745-2752 **[0232]**
- **RIPPE et al.** *Mol. Cell Biol.,* 1990, vol. 10, 689-695 **[0232]**
- **GOPAL, T.V.** *Mol Cell Biol.,* May 1985, vol. 5 (5), 1188-90 **[0233]**
- **FECHHEIMER et al.** *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA,* 1987, vol. 84, 8463-8467 **[0234]**
- **GHOSH ; BACHHAWAT.** *Liver Diseases, Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific Receptors and Ligands,* 1991, 87-104 **[0235]**
- **WU ; WU.** *J. Biol. Chem.,* 1987, vol. 262, 4429-4432 **[0236]**
- **WAGNER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 1990, vol. 87 (9), 3410-3414 **[0236]**
- **PERALES et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 1994, vol. 91, 4086-4090 **[0236]**
- **WU ; WU.** *Adv. Drug Delivery Rev.,* 1993, vol. 12, 159-167 **[0236]**
- **NICOLAU et al.** *Methods Enzymol.,* 1987, vol. 149, 157-176 **[0237]**
- **KLEIN et al.** *Nature,* 1987, vol. 327, 70-73 **[0238]**
- **YANG et al.** *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA,* 1990, vol. 87, 9568-9572 **[0238]**
- **RENAN, M. J.** *Radiother Oncol.,* 1990, vol. 19, 197-218 **[0240]**
- **HAY, R.T. et al.** *J Mol Biol.,* 05 June 1984, vol. 175 (4), 493-510 **[0242]**
- **HEARING et al.** *J. (1987) Virol.,* 1987, vol. 67, 2555-2558 **[0243] [0245]**
- **LEVRERO et al.** *Gene,* 1991, vol. 101, 195-202 **[0243]**
- **TIBBETTS.** *Cell,* 1977, vol. 12, 243-249 **[0245]**
- **HEARING ; SHENK.** *J. Mol. Biol.,* 1983, vol. 167, 809-822 **[0245]**
- **COFFIN.** Virology. Raven Press, 1990, 1437-1500 **[0248]**
- **MANN et al.** *Cell,* 1983, vol. 33, 153-159 **[0249]**
- **NICOLAS, J.F. ; RUBENSTEIN, J.L.R.** Vectors: a Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses. 1988 **[0249]**
- **NICOLAS ; RUBENSTEIN ; TEMIN et al.** Gene Transfer. Plenum Press, 1986, 149-188 **[0249]**
- **PASKIND et al.** *Virology,* 1975, vol. 67, 242-248 **[0249]**
- **ROUX et al.** *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA,* 1989, vol. 86, 9079-9083 **[0249]**
- **SAMULSKI et al.** *J. Virol.,* 1987, vol. 61, 3096-3101 **[0253]**
- **CARTER ; FLOTTE.** *Ann. N.Y. Acad. Sci.,* 1995, vol. 770, 79-90 **[0254]**
- **CHATTEIJEE et al.** *Ann. N.Y. Acad. Sci.,* 1995, vol. 770, 79-90 **[0254]**
- **FERRARI et al.** *J. Virol.,* 1996, vol. 70, 3227-3234 **[0254]**
- **FISHER et al.** *J. Virol.,* 1996, vol. 70, 520-532 **[0254] [0255]**
- **FLOTTE et al.** *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA,* 1993, vol. 90, 10613-10617 **[0254] [0255]**
- **GOODMAN et al.** *Blood,* 1994, vol. 84, 1492-1500 **[0254]**
- **KAPLITT et al.** *Nat'l Genet.,* 1994, vol. 8, 148-153 **[0254]**
- **KAPLITT, M.G. et al.** *Ann Thorac Surg,* December 1996, vol. 62 (6), 1669-76 **[0254]**

- **KESSLER et al.** *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 1996, vol. 93, 14082-14087 **[0254]**
- **KOEBERL et al.** *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94, 1426-1431 **[0254]**
- **MIZUKAMI et al.** *Virology*, 1996, vol. 217, 124-130 **[0254]**
- **MCCOWN et al.** *Brain Res.*, 1996, vol. 713, 99-107 **[0255]**
- **PING et al.** *Microcirculation*, 1996, vol. 3, 225-228 **[0255]**
- **XIAO et al.** *J. Virol.*, 1996, vol. 70, 8098-8108 **[0255]**
- **RIDGEWAY.** *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, 1988, 467-492 **[0256]**
- **BAICHWAL ; SUGDEN.** *Gene Transfer*, 1986, 117-148 **[0256]**
- **COUPAR et al.** *Gene*, 1988, vol. 68, 1-10 **[0256]**
- **STRAATHOF KC ; PULE MA ; YOTNDA P ; DOTTI G ; VANIN EF ; BRENNER MK ; HESLOP HE ; SPENCER DM ; ROONEY CM.** An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy. *Blood*, 2005, vol. 105 (11), 4247-54 **[0279] [0548]**
- **FAN L ; FREEMAN KW ; KHAN T ; PHAM E ; SPENCER DM.** Improved artificial death switches based on caspases and FADD. *Hum Gene Ther.*, 1999, vol. 10 (14), 2273-85 **[0279]**
- **SPENCER DM ; WANDLESS TJ ; SCHREIBER SL ; CRABTREE GR.** Controlling signal transduction with synthetic ligands. *Science*, 1993, vol. 262 (5136), 1019-24 **[0279] [0548]**
- **ACEVEDO VD ; GANGULA RD ; FREEMAN KW ; LI R ; ZHANG Y ; WANG F ; AYALA GE ; PETERSON LE ; ITTMANN M ; SPENCER DM.** Inducible FGFR-1 activation leads to irreversible prostate adenocarcinoma and an epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Cell*, 2007, vol. 12 (6), 559-71 **[0279] [0548]**
- **SPENCER DM ; BELSHAW PJ ; CHEN L ; HO SN ; RANDAZZO F ; CRABTREE GR ; SCHREIBER SL.** Functional analysis of Fas signaling in vivo using synthetic inducers of dimerization. *Curr Biol*, 1996, vol. 6 (7), 839-47 **[0279] [0548]**
- **STRASSER A ; CORY S ; ADAMS JM.** Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. *EMBO J.*, 2011, vol. 30 (18), 3667-83 **[0279] [0548]**
- **NARAYANAN P ; LAPTEVA N ; SEETHAMMAGARI M ; LEVITT JM ; SLAWIN KM ; SPENCER DM.** A composite MyD88/CD40 switch synergistically activates mouse and human dendritic cells for enhanced antitumor efficacy. *J Clin Invest.*, 2011, vol. 121 (4), 1524-34 **[0279]**
- **SABATINI DM ; ERDJUMENT-BROMAGE H ; LUI M ; TEMPST P ; SNYDER SH.** RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell*, 1994, vol. 78 (1), 35-43 **[0279] [0548]**
- **BROWN EJ ; ALBERS MW ; SHIN TB ; ICHIKAWA K ; KEITH CT ; LANE WS ; SCHREIBER SL.** A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature*, 1994, vol. 369 (6483), 756-8 **[0279] [0548]**
- **CHEN J ; ZHENG XF ; BROWN EJ ; SCHREIBER SL.** Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1995, vol. 92 (11), 4947-51 **[0279]**
- **CHOI J ; CHEN J ; SCHREIBER SL ; CLARDY J.** Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science*, 1996, vol. 273 (5272), 239-42 **[0279]**
- **HO SN ; BIGGAR SR ; SPENCER DM ; SCHREIBER SL ; CRABTREE GR.** Dimeric ligands define a role for transcriptional activation domains in reinitiation. *Nature*, 1996, vol. 382 (6594), 822-6 **[0279] [0548]**
- **KLEMM JD ; BEALS CR ; CRABTREE GR.** Rapid targeting of nuclear proteins to the cytoplasm. *Curr Biol.*, 1997, vol. 7 (9), 638-44 **[0279]**
- **BAYLE JH ; GRIMLEY JS ; STANKUNAS K ; GESTWICKI JE ; WANDLESS TJ ; CRABTREE GR.** Rapamycin analogs with differential binding specificity permit orthogonal control of protein activity. *Chem Biol.*, 2006, vol. 13 (1), 99-107 **[0279] [0548]**
- **STANKUNAS K ; BAYLE JH ; GESTWICKI JE ; LIN YM ; WANDLESS TJ ; CRABTREE GR.** Conditional protein alleles using knockin mice and a chemical inducer of dimerization. *Mol Cell*, 2003, vol. 12 (6), 1615-24 **[0279] [0548]**
- **STANKUNAS K ; BAYLE JH ; HAVRANEK JJ ; WANDLESS TJ ; BAKER D ; CRABTREE GR ; GESTWICKI JE.** Rescue of Degradation-Prone Mutants of the FK506-Rapamycin Binding (FRB) Protein with Chemical Ligands. *Chembiochem*, 2007 **[0279] [0548]**
- Remington's Pharmaceutical Sciences. 1035-1038, 1570-1580 **[0285]**
- **WALTER, E.A. et al.** *N. Engl. J. Med.*, 1995, vol. 333, 1038-44 **[0287]**
- **ROONEY, C.M. et al.** *Blood*, 1998, vol. 92, 1549-55 **[0287]**
- **DUDLEY, M.E. et al.** *Science*, 2002, vol. 298, 850-54 **[0287]**
- **MARJIT, W.A. et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, vol. 100, 2742-47 **[0287]**
- **BONINI C et al.** *Science*, 1997, vol. 276, 1719-1724 **[0287]**
- **TIBERGHIEN P et al.** *Blood*, 2001, vol. 97, 63-72 **[0287]**
- **CICERI, F. et al.** *Lancet Oncol.*, 2009, vol. 262, 1019-24 **[0287]**
- **RIDDELL SR et al.** *Nat Med.*, 1996, vol. 2, 216-23 **[0287]**

- **FREYTAG SO et al.** *Cancer Res.*, 2002, vol. 62, 4968-4976 **[0287]**
- **INTRONA M et al.** *Hum Gene Ther.*, 2000, vol. 11, 611-620 **[0287]**
- **DONNELLY, ML.** *J. Gen. Virol.*, 2001, vol. 82, 1013-25 **[0296]**
- **SEIFERT, R. ; K. WENZEL-SEIFERT.** Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2002, vol. 366 (5), 381-416 **[0473]**
- **ROOSE, J.P. et al.** T cell receptor-independent basal signaling via Erk and Abl kinases suppresses RAG gene expression. *PLoS Biol*, 2003, vol. 1 (2), E53 **[0473]**
- **TZE, L.E. et al.** Basal immunoglobulin signaling actively maintains developmental stage in immature B cells. *PLoS Biol*, 2005, vol. 3 (3), e82 **[0473]**
- **SCHRAM, B.R. et al.** B cell receptor basal signaling regulates antigen-induced Ig light chain rearrangements. *J Immunol*, 2008, vol. 180 (7), 4728-41 **[0473]**
- **RANDALL, K.L. et al.** Dock8 mutations cripple B cell immunological synapses, germinal centers and long-lived antibody production. *Nat Immunol*, 2009, vol. 10 (12), 1283-91 **[0473]**
- **KOUSKOFF, V. et al.** B cell receptor expression level determines the fate of developing B lymphocytes: receptor editing versus selection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, vol. 97 (13), 7435-9 **[0473]**
- **HONG, T. et al.** A simple theoretical framework for understanding heterogeneous differentiation of CD4+ T cells. *BMC Syst Biol*, 2012, vol. 6, 66 **[0473]**
- **RUDD, M.L. ; TUA-SMITH ; D.B. STRAUS.** Lck SH3 domain function is required for T-cell receptor signals regulating thymocyte development. *Mol Cell Biol*, 2006, vol. 26 (21), 7892-900 **[0473]**
- **SORKIN, A. ; M. VON ZASTROW.** Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, vol. 10 (9), 609-22 **[0473]**
- **LUNING PRAK, E.T. ; M. MONESTIER ; R.A. ELSENBERG.** B cell receptor editing in tolerance and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci*, 2011, vol. 1217, 96-121 **[0473]**
- **BOSS, W.F. et al.** Basal signaling regulates plant growth and development. *Plant Physiol*, 2010, vol. 154 (2), 439-43 **[0473]**
- **TAO, Y.X.** Constitutive activation of G protein-coupled receptors and diseases: insights into mechanisms of activation and therapeutics. *Pharmacol Ther*, 2008, vol. 120 (2), 129-48 **[0473]**
- **SPIEGEL, A.M.** Defects in G protein-coupled signal transduction in human disease. *Annu Rev Physiol*, 1996, vol. 58, 143-70 **[0473]**
- **SHIOZAKI, E.N. et al.** Mechanism of XIAP-mediated inhibition of Caspase-9. *Mol Cell*, 2003, vol. 11 (2), 519-27 **[0473]**
- **RENATUS, M. et al.** Dimer formation drives the activation of the cell death protease Caspase-9. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, vol. 98 (25), 14250-5 **[0473]**
- **SHI, Y.** Mechanisms of Caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell*, 2002, vol. 9 (3), 459-70 **[0473]**
- **SHIOZAKI, E.N. ; J. CHAI ; Y. SHI.** Oligomerization and activation of Caspase-9, induced by Apaf-1 CARD. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, vol. 99 (7), 4197-202 **[0473]**
- **STRAATHOF, K.C. et al.** An inducible Caspase-9 safety switch for T-cell therapy. *Blood*, 2005, vol. 105 (11), 4247-54 **[0473]**
- **MACCORKLE, R.A. ; K.W. FREEMAN ; D.M. SPENCER.** Synthetic activation of Caspases: artificial death switches. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, vol. 95 (7), 3655-60 **[0473]**
- **DI STASI, A. et al.** Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N Engl J Med*, 2011, vol. 365 (18), 1673-83 **[0473]**
- **CHANG, W.C. et al.** Modifying ligand-induced and constitutive signaling of the human 5-HT4 receptor. *PLoS One*, 2007, vol. 2 (12), e1317 **[0473]**
- **BLOOM, J.D. ; F.H. ARNOLD.** In the light of directed evolution: pathways of adaptive protein evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, vol. 106 (1), 9995-10000 **[0473]**
- **BOATRIGHT, K.M. ; G.S. SALVESEN.** Mechanisms of Caspase activation. *Curr Opin Cell Biol*, 2003, vol. 15 (6), 725-31 **[0473]**
- **BOATRIGHT, K.M. et al.** A unified model for apical Caspase activation. *Mol Cell*, 2003, vol. 11 (2), 529-41 **[0473]**
- **CHAO, Y. et al.** Engineering a dimeric Caspase-9: a re-evaluation of the induced proximity model for Caspase activation. *PLoS Biol*, 2005, vol. 3 (6), e183 **[0473]**
- **STENNICKE, H.R. et al.** Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J Biol Chem*, 1999, vol. 274 (13), 8359-62 **[0473]**
- **BRADY, S.C. ; L.A. ALLAN ; P.R. CLARKE.** Regulation of Caspase-9 through phosphorylation by protein kinase C zeta in response to hyperosmotic stress. *Mol Cell Biol*, 2005, vol. 25 (23), 10543-55 **[0473]**
- **MARTIN, M.C. et al.** Protein kinase A regulates Caspase-9 activation by Apaf-1 downstream of cytochrome c. *J Biol Chem*, 2005, vol. 280 (15), 15449-55 **[0473]**
- **CARDONE, M.H. et al.** Regulation of cell death protease Caspase-9 by phosphorylation. *Science*, 1998, vol. 282 (5392), 1318-21 **[0473]**
- **RAINA, D. et al.** c-Abl tyrosine kinase regulates Caspase-9 autocleavage in the apoptotic response to DNA damage. *J Biol Chem*, 2005, vol. 280 (12), 11147-51 **[0473]**

- **PAPWORTH, C. ; BAUER, J. C. ; BRAMAN, J. ; WRIGHT, D. A.** Site-directed mutagenesis in one day with >80% efficiency. *Strategies,* 1996, vol. 9 (3), 3-4 **[0473]**
- **SPENCER, D.M. et al.** Functional analysis of Fas signaling in vivo using synthetic inducers of dimerization. *Curr Biol,* 1996, vol. 6 (7), 839-47 **[0473]**
- **HSIAO, E.C. et al.** Constitutive Gs activation using a single-construct tetracycline-inducible expression system in embryonic stem cells and mice. *Stem Cell Res Ther,* 2011, vol. 2 (2), 11 **[0473]**
- **WALDNER, C. et al.** Double conditional human embryonic kidney cell line based on FLP and PhiC31 mediated transgene integration. *BMC Res Notes,* 2011, vol. 4, 420 **[0473]**
- **BRENTJENS RJ ; DAVILA ML ; RIVIERE I et al.** CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med,* 2013, vol. 5 (177ra38 **[0492]**
- **PULE MA ; STRAATHOF KC ; DOTTI G et al.** A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells. *Mol Ther,* 2005, vol. 12, 933-41 **[0492]**
- **NARAYANAN P ; LAPTEVA N ; SEETHAMMAGARI M et al.** A composite MyD88/CD40 switch synergistically activates mouse and human dendritic cells for enhanced antitumor efficacy. *J Clin Invest,* vol. 121, 1524-34 **[0492]**
- **ANURATHAPAN U ; CHAN RC ; HINDI HF et al.** Kinetics of tumor destruction by chimeric antigen receptor-modified T cells. *Mol Ther,* 2014, vol. 22, 623-33 **[0492]**
- **CRADDOCK JA ; LU A ; BEAR A et al.** Enhanced tumor trafficking of GD2 chimeric antigen receptor T cells by expression of the chemokine receptor CCR2b. *J Immunother,* 2010, vol. 33, 780-8 **[0492]**
- **LEE DW ; GARDNER R ; PORTER DL et al.** Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood,* 2014, vol. 124, 188-95 **[0492]**
- **BECKER ML ; NEAR R ; MUDGETT-HUNTER M et al.** Expression of a hybrid immunoglobulin-T cell receptor protein in transgenic mice. *Cell,* 1989, vol. 58, 911-21 **[0492]**
- **GOVERMAN J ; GOMEZ SM ; SEGESMAN KD et al.** Chimeric immunoglobulin-T cell receptor proteins form functional receptors: implications for T cell receptor complex formation and activation. *Cell,* 1990, vol. 60, 929-39 **[0492]**
- **GROSS G ; WAKS T ; ESHHAR Z.** Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 1989, vol. 86, 10024-8 **[0492]**
- **KUWANA Y ; ASAKURA Y ; UTSUNOMIYA N et al.** Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions and T-cell receptor-derived C regions. *Biochem Biophys Res Commun,* 1987, vol. 149, 960-8 **[0492]**
- **JENSEN MC ; POPPLEWELL L ; COOPER LJ et al.** Antitransgene rejection responses contribute to attenuated persistence of adoptively transferred CD20/CD19-specific chimeric antigen receptor redirected T cells in humans. *Biol Blood Marrow Transplant,* 2010, vol. 16, 1245-56 **[0492]**
- **PARK JR ; DIGIUSTO DL ; SLOVAK M et al.** Adoptive transfer of chimeric antigen receptor re-directed cytolytic T lymphocyte clones in patients with neuroblastoma. *Mol Ther,* 2007, vol. 15, 825-33 **[0492]**
- **RAMOS CA ; DOTTI G.** Chimeric antigen receptor (CAR)-engineered lymphocytes for cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther,* 2011, vol. 11, 855-73 **[0492]**
- **FINNEY HM ; LAWSON AD ; BEBBINGTON CR et al.** Chimeric receptors providing both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene product. *J Immunol,* 1998, vol. 161, 2791-7 **[0492]**
- **HOMBACH A ; WIECZARKOWIECZ A ; MARQUARDT T et al.** Tumor-specific T cell activation by recombinant immunoreceptors: CD3 zeta signaling and CD28 costimulation are simultaneously required for efficient IL-2 secretion and can be integrated into one combined CD28/CD3 zeta signaling receptor molecule. *J Immunol,* 2001, vol. 167, 6123-31 **[0492]**
- **MAHER J ; BRENTJENS RJ ; GUNSET G et al.** Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor. *Nat Biotechnol,* 2002, vol. 20, 70-5 **[0492]**
- **IMAI C ; MIHARA K ; ANDREANSKY M et al.** Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia,* 2004, vol. 18, 676-84 **[0492]**
- **WANG J ; JENSEN M ; LIN Y et al.** Optimizing adoptive polyclonal T cell immunotherapy of lymphomas, using a chimeric T cell receptor possessing CD28 and CD137 costimulatory domains. *Hum Gene Ther,* 2007, vol. 18, 712-25 **[0492]**
- **ZHAO Y ; WANG QJ ; YANG S et al.** A herceptin-based chimeric antigen receptor with modified signaling domains leads to enhanced survival of transduced T lymphocytes and antitumor activity. *J Immunol,* 2009, vol. 183, 5563-74 **[0492]**
- **MILONE MC ; FISH JD ; CARPENITO C et al.** Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo. *Mol Ther,* 2009, vol. 17, 1453-64 **[0492]**
- **YVON E ; DEL VECCHIO M ; SAVOLDO B et al.** Immunotherapy of metastatic melanoma using genetically engineered GD2-specific T cells. *Clin Cancer Res,* 2009, vol. 15, 5852-60 **[0492]**

- **SAVOLDO B ; RAMOS CA ; LIU E et al.** CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients. *J Clin Invest,* 2011, vol. 121, 1822-6 **[0492]**
- **KALINSKI P ; HILKENS CM ; WIERENGA EA et al.** T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today,* 1999, vol. 20, 561-7 **[0492]**
- **KEMNADE JO ; SEETHAMMAGARI M ; NARAYANAN P et al.** Off-the-shelf Adenoviral-mediated Immunotherapy via Bicistronic Expression of Tumor Antigen and iMyD88/CD40 Adjuvant. *Mol Ther,* 2012 **[0492]**
- **SCHENTEN D ; NISH SA ; YU S et al.** Signaling through the adaptor molecule MyD88 in CD4+ T cells is required to overcome suppression by regulatory T cells. *Immunity,* 2014, vol. 40, 78-90 **[0492]**
- **MARTIN S ; PAHARI S ; SUDAN R et al.** CD40 signaling in CD8+CD40+ T cells turns on contra-T regulatory cell functions. *J Immunol,* 2010, vol. 184, 5510-8 **[0492]**
- **LUENGO JI.** *J. Org Chem,* vol. 59 (94), 6512-13 **[0509]**
- **LUENGO et al.** *J. Org. Chem,* 1994, vol. 59 (6512), 16, , 17 **[0539]**
- **FAN L ; FREEMAN KW ; KHAN T ; PHAM E ; SPENCER DM.** Improved artificial death switches based on caspases and FADD. *Hum Gene Ther,* 1999, vol. 10 (14), 2273-85 **[0548]**
- **CHEN J ; ZHENG XF ; BROWN EJ ; SCHREIBER SL.** Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. *Proc Natl Acad Sci U S A.,* 1995, vol. 92 (11), 4947-51 **[0548]**
- **CHOI J ; CHEN J ; SCHREIBER SL ; CLARDY J.** Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science,* 1996, vol. 273 (5272), 239-42 **[0548]**
- **KLEMM JD ; BEALS CR ; CRABTREE GR.** Rapid targeting of nuclear proteins to the cytoplasm. *Curr Biol,* 1997, vol. 7 (9), 638-44 **[0548]**
- **LIBERLES SD ; DIVER ; AUSTIN DJ ; SCHREIBER SL.** Inducible gene expression and protein translocation using nontoxic ligands identified by a mammalian three-hybrid screen. *Proc Natl Acad Sci U S A.,* 1997, vol. 94 (15), 7825-30 **[0548]**
- **LUENGO JI ; YAMASHITA DS ; DUNNINGTON D ; BECK AK ; ROZAMUS LW ; YEN HK ; BOSSARD MJ ; LEVY MA ; HAND A ; NEWMAN-TARR T et al.** Structure-activity studies of rapamycin analogs: evidence that the C-7 methoxy group is part of the effector domain and positioned at the FKBP12-FRAP interface. *Chem Biol.,* 1995, vol. 2 (7), 471-81 **[0548]**
- **LUENGO et al.** *J. Org. Chem,* 1994, vol. 59 (6512), 17, , 18 **[0563]**