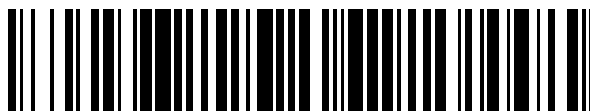


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 791 598**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00	(2006.01)
A61K 38/16	(2006.01)
A61K 38/17	(2006.01)
A61K 38/48	(2006.01)
A61K 35/17	(2015.01)
A61K 35/28	(2015.01)
A61K 35/30	(2015.01)
A61K 35/545	(2015.01)
C12N 5/00	(2006.01)
C12N 9/64	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.06.2014 PCT/US2014/040964**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **11.12.2014 WO14197638**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2014 E 14807405 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2020 EP 3004329**

54 Título: **Métodos para inducir apoptosis parcial utilizando polipéptidos de caspasa**

30 Prioridad:

05.06.2013 US 201361831428 P
07.03.2014 US 201461949847 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.11.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

SLAWIN, KEVIN;
SPENCER, DAVID y
FOSTER, AARON, EDWARD

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 791 598 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para inducir apoptosis parcial utilizando polipéptidos de caspasa

5 **Campo**

La presente invención se define en las reivindicaciones. La tecnología descrita como se utiliza en la presente memoria hace referencia, en parte, a métodos para inducir la apoptosis parcial de células que expresan un polipéptido de caspasa inducible. La tecnología se refiere además, en parte, a métodos para inducir la apoptosis parcial de células que expresan un polipéptido de caspasa inducible modificado, que tiene una curva de respuesta a la dosis modificada para el inductor de ligando multimérico. Esta tecnología también se refiere, en parte, a métodos de terapia celular utilizando células que expresan el polipéptido de caspasa inducible o el polipéptido de caspasa inducible modificado, donde la proporción de células que expresan el polipéptido de caspasa eliminadas mediante apoptosis está relacionada con la cantidad administrada del inductor de ligando multimérico.

15 **Antecedentes**

En la mayoría de terapias con linfocitos T, tales como las terapias con los linfocitos T que expresan receptores de antígenos quiméricos (CAR), infusiones de linfocitos donantes (DLI), o linfocitos T agregados después de un trasplante de hemocitoblastos (HSCTS), la relevancia clínica de la eficacia demostrada frente a los tumores se ve un tanto disminuida por el riesgo de efectos adversos fuera del objetivo o fuera del órgano. Además, un exceso de efectos deseados, tales como los dirigidos contra masas tumorales grandes, pueden producir tormentas de citoquinas que están asociadas con el síndrome de lisis tumoral (TLS), síndrome de liberación de citoquinas (CRS) o síndrome de activación macrofágica (MAS). Como resultado, existe gran interés en el desarrollo de un “gen suicida” estable y fiable que pueda eliminar linfocitos T o citoblastos transferidos si desencadenan eventos adversos graves (SAE) o se convierten en obsoletos después del tratamiento.

Los métodos para destruir selectivamente células terapéuticas mediante la inducción de apoptosis selectiva, si se produce un evento adverso, se analizan detalladamente en la patente con número de publicación US-2011/0286980, y titulada “METHODS FOR INDUCING SELECTIVE APOPTOSIS” (Métodos para inducir la apoptosis selectiva), donde Malcolm K. Brenner se cita como el inventor, y en el documento WO 2011/146862. Los polipéptidos de caspasa-9 modificados se analizan detalladamente en la patente con número de publicación US-2014/0255360 y titulada “MODIFIED CASPASE POLYPEPTIDES AND USES THEREOF” (Polipéptidos de caspasa modificados y usos de los mismos), donde David Spencer y col. se citan como los inventores. Sadelain y col. (Abril 2013), Cancer Discovery, 388-398 describe los principios básicos del diseño de receptores de antígenos quiméricos. Stennicke y col. (1999), The Journal of Biological Chemistry, 274 (13):8359-8362 describe formas recombinantes de mutaciones que contienen procaspasa-9 que deshabilitan uno o ambos sitios de procesamiento interdominio del zimógeno.

40 Existe la necesidad de un método que equilibre la capacidad de eliminar rápidamente los posibles efectos negativos de las células del donante utilizadas en terapia celular a la vez que se conservan una parte o todos los efectos beneficiosos de la terapia.

45 **Resumen**

La presente invención se define en las reivindicaciones. En consecuencia, la presente invención se refiere, en un primer aspecto, a un ligando multimérico para usar en un método para el tratamiento del cáncer; comprendiendo dicho método controlar la supervivencia de las células terapéuticas en un sujeto, en donde el método se caracteriza por a) trasplantar células terapéuticas que se han transfectado o transducido con un ácido nucleico que codifica un polipéptido quimérico que comprende una región de multimerización y un polipéptido de caspasa-9 que comprende la secuencia de aminoácidos de la Id. de sec. n.º: 9 o un polipéptido de caspasa-9 modificado en el sujeto, en donde el polipéptido de caspasa-9 modificado comprende (i) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la Id. de sec. n.º: 9, y (ii) al menos una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en S144A, S144D, Y153A, Y153F, S183A, S195A, S196A, S196D, S307A, D315A, A316G, T317A, T317C, T317E, T317S, P318A, F319A, F319W, F326K, D327G, D327K, D327R, Q328K, Q328R, L329E, L329G, L329K, D330A, D330E, D330G, D330N, D330S, D330V, A331K, C403A, C403S, C403T, F404T, F404W, F404Y, N405A, N405F, N405Q, N405T, F406A, F406T, F406W y F406Y; b) administrar posteriormente dicho ligando multimérico a dicho sujeto en una cantidad eficaz para destruir menos del 50 % de células terapéuticas trasplantadas que expresan el polipéptido de caspasa-9, en donde un nivel terapéuticamente eficaz de células terapéuticas sigue activo en el sujeto después de administrar el ligando multimérico; o administrar posteriormente dicho ligando multimérico a dicho sujeto en una cantidad eficaz para destruir menos del 50 % de células terapéuticas trasplantadas que expresan el polipéptido de caspasa-9 modificado, en donde un nivel terapéuticamente eficaz de células terapéuticas sigue activo en el sujeto después de administrar el ligando multimérico; y en donde dicho ligando multimérico se une a la región de multimerización; y dicho polipéptido de caspasa-9 modificado tiene una curva de respuesta a la dosis alargada en respuesta al ligando multimérico en comparación con un polipéptido de caspasa-9 que no está modificado. La presente invención se refiere, en un segundo aspecto, a un ligando

5 multimérico para usar en un método para el tratamiento de la enfermedad del injerto contra el hospedador; comprendiendo dicho método controlar la supervivencia de las células terapéuticas en un sujeto, en donde el método se caracteriza por a) trasplantar células terapéuticas que se han transfectado o transducido con un ácido nucleico que codifica un polipéptido quimérico que comprende una región de multimerización y un polipéptido de caspasa-9 que comprende la secuencia de aminoácidos de la Id. de sec. n.º: 9 o un polipéptido de caspasa-9 modificado en el sujeto, en donde el polipéptido de caspasa-9 modificado comprende (i) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la Id. de sec. n.º: 9, y (ii) al menos una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en S144A, S144D, Y153A, Y153F, S183A, S195A, S196A, S196D, S307A, D315A, A316G, T317A, T317C, T317E, T317S, P318A, F319A, F319W, F326K, D327G, D327K, D327R, Q328K, Q328R, L329E, L329G, L329K, D330A, D330E, D330G, D330N, D330S, D330V, A331K, C403A, C403S, C403T, F404T, F404W, F404Y, N405A, N405F, N405Q, N405T, F406A, F406T, F406W y F406Y; b) administrar posteriormente dicho ligando multimérico a dicho sujeto en una cantidad eficaz para destruir menos del 50 % de células terapéuticas trasplantadas que expresan el polipéptido de caspasa-9, en donde un nivel terapéuticamente eficaz de células terapéuticas sigue activo en el sujeto después de administrar el ligando multimérico; o administrar posteriormente dicho ligando multimérico a dicho sujeto en una cantidad eficaz para destruir menos del 50 % de células terapéuticas trasplantadas que expresan el polipéptido de caspasa-9 modificado, en donde un nivel terapéuticamente eficaz de células terapéuticas sigue activo en el sujeto después de administrar el ligando multimérico; y en donde dicho ligando multimérico se une a la región de multimerización; y dicho polipéptido de caspasa-9 modificado tiene una curva de respuesta a la dosis alargada en respuesta al ligando multimérico en comparación con un polipéptido de caspasa-9 que no está modificado.

25 Según una realización preferida del primer y segundo aspecto de la invención, menos del 40 % de las células terapéuticas trasplantadas que expresan el polipéptido de caspasa-9 o menos del 40 % de las células terapéuticas trasplantadas que expresan el polipéptido de caspasa-9 modificado se eliminan después del uso del ligando multimérico. Según una realización preferida más del primer y segundo aspecto de la invención, las células terapéuticas expresan además un receptor de antígeno quimérico. Según otra realización preferida adicional del primer y del segundo aspecto de la invención, la al menos una sustitución de aminoácido es D330A, D330E, o N405Q. Según otra realización preferida del primer y segundo aspecto de la invención, se va a utilizar una dosis adicional del ligando multimérico, donde al menos un 10 % de las células terapéuticas trasplantadas que expresan el polipéptido de caspasa-9 o el polipéptido de caspasa-9 modificado se van a destruir en comparación con el número de células trasplantadas antes de la dosis adicional.

35 Además, la presente invención se refiere en un tercer aspecto a un ligando multimérico para usar en un método para el tratamiento del cáncer; comprendiendo dicho método controlar la supervivencia de las células terapéuticas trasplantadas en un sujeto, en donde el método se caracteriza por a) trasplantar un primer conjunto de células terapéuticas al sujeto, en donde el primer conjunto de células terapéuticas comprende (i) un polinucleótido que codifica un polipéptido quimérico que comprende una región de multimerización y un primer polipéptido de caspasa-9 que comprende la secuencia de aminoácidos con Id. de sec. n.º: 9 o un primer polipéptido de caspasa-9 modificado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la Id. de sec. n.º: 9, y (ii) un receptor de antígeno quimérico; b) trasplantar un segundo conjunto de células terapéuticas al sujeto, en donde el segundo conjunto de células terapéuticas comprende (i) un polinucleótido que codifica un polipéptido quimérico que comprende una región de multimerización y un segundo polipéptido de caspasa-9 modificado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la Id. de sec. n.º: 9, y (ii) un receptor de antígeno quimérico; en donde el primer polipéptido de caspasa-9, o el primer polipéptido de caspasa-9 modificado, y el segundo polipéptido de caspasa-9 modificado, comprenden diferentes secuencias de aminoácidos y tienen diferentes actividades basales, diferentes CI50 y/o curvas de respuesta a la dosis alargadas diferentes; y el primer y segundo polipéptidos de caspasa-9 modificados comprenden, cada uno de ellos, una sustitución de aminoácido diferente seleccionada del grupo que consiste en S144A, S144D, Y153A, Y153F, S183A, S195A, S196A, S196D, S307A, D315A, A316G, T317A, T317C, T317E, T317S, P318A, F319A, F319W, F326K, D327G, D327K, D327R, Q328K, Q328R, L329E, L329G, L329K, D330A, D330E, D330G, D330N, D330S, D330V, A331K, C403A, C403S, C403T, F404T, F404W, F404Y, N405A, N405F, N405Q, N405T, F406A, F406T, F406W y F406Y; y c) administrar dicho ligando multimérico al sujeto en una cantidad eficaz para destruir más del primer conjunto de células terapéuticas que del segundo conjunto de células terapéuticas, en donde un nivel terapéuticamente eficaz de células terapéuticas del segundo conjunto sigue activo en el sujeto después administrar el ligando multimérico, y en donde dicho ligando multimérico se une a dicha región de multimerización. También además, la presente invención se refiere a un ligando multimérico para usar en un método para el tratamiento de la enfermedad del injerto contra el hospedador; comprendiendo dicho método controlar la supervivencia de las células terapéuticas en un sujeto, en donde el método se caracteriza por a) trasplantar un primer conjunto de células terapéuticas al sujeto, en donde el primer conjunto de células terapéuticas comprende (i) un polinucleótido que codifica un polipéptido quimérico que comprende una región de multimerización y un primer polipéptido de caspasa-9 que comprende la secuencia de aminoácidos con Id. de sec. n.º: 9 o un primer polipéptido de caspasa-9 modificado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la Id. de sec. n.º: 9, y (ii) un receptor de antígeno quimérico; b) trasplantar un segundo conjunto de células terapéuticas al sujeto, en donde el segundo conjunto de células terapéuticas comprende (i) un polinucleótido que codifica un polipéptido quimérico que comprende una región de multimerización y un segundo polipéptido de caspasa-9 modificado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la Id. de sec. n.º: 9, y (ii) un receptor de antígeno quimérico; en donde el primer polipéptido de caspasa-9, o el primer polipéptido de caspasa-9 modificado, y el segundo polipéptido de caspasa-9 modificado, comprenden diferentes secuencias de aminoácidos y tienen diferentes actividades basales,

diferentes CI₅₀ y/o curvas de respuesta a la dosis alargadas diferentes; y el primer y segundo polipéptidos de caspasa-9 modificados comprenden, cada uno de ellos, una sustitución de aminoácido diferente seleccionada del grupo que consiste en S144A, S144D, Y153A, Y153F, S183A, S195A, S196A, S196D, S307A, D315A, A316G, T317A, T317C, T317E, T317S, P318A, F319A, F319W, F326K, D327G, D327K, D327R, Q328K, Q328R, L329E, L329G, L329K, D330A, D330E, D330G, D330N, D330S, D330V, A331K, C403A, C403S, C403T, F404T, F404W, F404Y, N405A, N405F, N405Q, N405T, F406A, F406T, F406W y F406Y; y c) administrar dicho ligando multimérico al sujeto en una cantidad eficaz para destruir más del primer conjunto de células terapéuticas que del segundo conjunto de células terapéuticas, en donde un nivel terapéuticamente eficaz de células terapéuticas del segundo conjunto sigue activo en el sujeto después administrar el ligando multimérico, y en donde dicho ligando multimérico se une a dicha región de multimerización. La presente invención se refiere en un cuarto aspecto a un ligando multimérico para usar en un método para el tratamiento de las células terapéuticas en un sujeto, en donde el método comprende controlar la supervivencia de células terapéuticas en un sujeto, en donde el método se caracteriza por a) trasplantar un primer conjunto de células terapéuticas al sujeto, en donde el primer conjunto de células terapéuticas comprende (i) un polinucleótido que codifica un polipéptido quimérico que comprende una región de multimerización y un primer polipéptido de caspasa-9 que comprende la secuencia de aminoácidos de la Id. de sec. n.º: 9 o un primer polipéptido de caspasa-9 modificado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la Id. de sec. n.º: 9, y (ii) un receptor de antígeno quimérico; b) trasplantar un segundo conjunto de células terapéuticas al sujeto, en donde el segundo conjunto de células terapéuticas comprende (i) un polinucleótido que codifica un polipéptido quimérico que comprende una región de multimerización y un segundo polipéptido de caspasa-9 modificado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la Id. de sec. n.º: 9, y (ii) un receptor de antígeno quimérico; en donde el primer polipéptido de caspasa-9, o el primer polipéptido de caspasa-9 modificado, y el segundo polipéptido de caspasa-9 modificado, comprenden diferentes secuencias de aminoácidos y tienen diferentes actividades basales, diferentes CI₅₀ y/o diferentes curvas de respuesta a la dosis alargadas; y el primer y segundo polipéptidos de caspasa-9 modificados comprenden, cada uno de ellos, una sustitución de aminoácido diferente seleccionada del grupo que consiste en S144A, S144D, Y153A, Y153F, S183A, S195A, S196A, S196D, S307A, D315A, A316G, T317A, T317C, T317E, T317S, P318A, F319A, F319W, F326K, D327G, D327K, D327R, Q328K, Q328R, L329E, L329G, L329K, D330A, D330E, D330G, D330N, D330S, D330V, A331K, C403A, C403S, C403T, F404T, F404W, F404Y, N405A, N405F, N405Q, N405T, F406A, F406T, F406W y F406Y; y c) administrar dicho ligando multimérico al sujeto en una cantidad eficaz para destruir más del primer conjunto de células terapéuticas que del segundo conjunto de células terapéuticas, en donde un nivel terapéuticamente eficaz de células terapéuticas del segundo conjunto sigue activo en el sujeto después administrar el ligando multimérico, y en donde dicho ligando multimérico se une a dicha región de multimerización.

Según una realización preferida del tercer y cuarto aspecto de la invención, se usa una dosis adicional del ligando multimérico, en donde al menos un 10 % de las células terapéuticas trasplantadas que expresan el primer o el segundo polipéptido de caspasa-9 se destruyen en comparación con el número de células trasplantadas antes de la dosis adicional. Según otra realización preferida del tercer y cuarto aspecto de la invención, la al menos una sustitución de aminoácido es D330A, D330E o N405Q.

Según una realización preferida de los cuatro aspectos de la invención, las células terapéuticas se seleccionan del grupo que consiste en hemocitoblastos, citoblastos mesenquimales (MSC), células plasmáticas (B), miocitos, linfocitos citolíticos naturales (NK), macrófagos, linfocitos infiltrados tumorales (TIL) y linfocitos T. Según una realización preferida adicional de los cuatro aspectos de la invención, la región de multimerización es una región variable FKBP12 que se une a AP1903 o AP20187. Según otra realización preferida adicional de los cuatro aspectos de la invención, la región variable FKBP12 es una región FKBP12v36. Según otra realización preferida más de todos los cuatro aspectos de la invención, el ligando es AP1903 o AP20187. Según otra realización preferida de todos los cuatro aspectos de la invención, se van a usar múltiples dosis de ligando multimérico, con un aumento de los niveles de dosificación entre las múltiples dosis y el aumento de los niveles de dosificación aumenta el número de células terapéuticas que se destruyen. Según una realización más preferida de los cuatro aspectos de la invención, la dosis se aumenta de 0,01 mg/kg a 1 mg/kg. Según una realización preferida del primer y segundo aspecto de la invención, en donde las células terapéuticas expresan además un receptor de antígeno quimérico, y el tercer y cuarto aspectos de la invención, el receptor de antígeno quimérico es un receptor de linfocitos T quimérico. Finalmente, de acuerdo con una realización preferida de los cuatro aspectos de la invención, el sujeto es humano.

Tras un evento adverso posterior a terapia celular, una fracción discreta de células puede eliminarse mediante apoptosis parcial, lo que permite que los efectos beneficiosos de la terapia celular se mantengan. Un ejemplo de una terapia celular es la transferencia de linfocitos T adoptivos después del trasplante de citoblastos CD34⁺. La administración de linfocitos T después de la transferencia de citoblastos ayuda a acelerar la reconstitución del sistema inmunitario del paciente receptor. Los linfocitos T pueden obtenerse de, por ejemplo, un donante relacionado o no relacionado coincidente. Cuando no está disponible un donante relacionado o no relacionado coincidente, o la enfermedad es demasiado agresiva para realizar una búsqueda de donantes amplia, el uso de un donante procedente de una familia haploidéntica de HLA. Dichos donantes pueden ser los padres, hermanos, o familiares en segundo grado. Dichas infusiones pueden potenciar la recuperación inmunitaria y reducir infecciones víricas y eliminar las células de leucemia precursoras de recidiva. Sin embargo, la coexistencia de linfocitos T alorreactivos en un injerto de citoblastos del donante puede producir la enfermedad del injerto contra hospedador (GvHD) en la que las células del donante reaccionan contra el receptor, que pueden dañar progresivamente la piel, el intestino, el hígado y otros órganos del receptor, frecuentemente con consecuencias fatales. Puede aplicarse un sistema caspasa-9 inducible a los

linfocitos T humanos, que luego se administran a pacientes de trasplante de citoblastos. Después de mostrar síntomas de la enfermedad del injerto contra el hospedador, la caspasa-9 se activa tras la administración de un ligando multimérico que produce la dimerización de la proteína e induce apoptosis de los linfocitos T activados alogénicos.

5 También puede aplicarse un interruptor de seguridad apoptótico basado en caspasa-9 a las células que expresan el receptor de antígeno quimérico terapéutico que expresan los receptores artificiales diseñados para transmitir la especificidad del antígeno a los linfocitos T. Incluyen un componente específico de antígeno, un componente transmembrana y un componente intracelular seleccionado para activar el linfocito T y proporcionar inmunidad específica. Los linfocitos T que expresan receptores de antígenos quiméricos se pueden utilizar en diversas terapias, incluidas terapias contra el cáncer. Si bien son eficaces contra los tumores, en algunos casos, estas terapias se han producido efectos adversos debido, en parte, a ataques no específicos al tejido sano. Puede proporcionarse un sistema caspasa-9 inducible a estas células terapéuticas antes de administrarlas a un paciente, para proporcionar la capacidad de destruir selectivamente las células terapéuticas si el paciente experimenta efectos adversos negativos, tales como, por ejemplo, toxicidad tanto en el órgano diana como en otros no diana, cuando el receptor de antígeno quimérico se dirige a un órgano que no es diana.

El interruptor de seguridad apoptótico basado en caspasa-9 puede usarse para eliminar citoblastos tisulares y su progenie, y para aumentar la destrucción oncolítica de tumores mediada por virus donde una destrucción excesiva podría limitar el efecto oncolítico.

Los métodos descritos en la presente memoria incluyen métodos para inducir la apoptosis en fracciones discretas de células que expresan caspasa-9. Mediante el uso de estos métodos, por ejemplo, cuando se produce la enfermedad del injerto contra el hospedador, se puede eliminar un porcentaje de células terapéuticas que producen la enfermedad del injerto contra el hospedador, dejando al mismo tiempo una cantidad suficiente de células terapéuticas para ayudar a reconstituir el sistema inmunitario del paciente. En otro ejemplo, tras eliminar la toxicidad en órganos no diana después del trasplante, se puede eliminar un porcentaje de células terapéuticas que expresan el receptor de antígeno quimérico, dejando al mismo tiempo una cantidad suficiente de células para que continúen su efecto terapéutico. En otro ejemplo más, cuando ambas células terapéuticas, tales como células que expresan el receptor de antígeno quimérico y los linfocitos T terapéuticos después del trasplante de citoblastos se transfunden al paciente, una de las poblaciones de células terapéuticas se puede eliminar al producirse un evento adverso, sin afectar significativamente la proporción de la otra población de linfocitos T terapéuticos.

Por lo tanto, también se describen en la presente memoria métodos para controlar la supervivencia de las células terapéuticas trasplantadas en un sujeto, que comprenden preparar o obtener células terapéuticas; transfectar o transducir a las células terapéuticas un ácido nucleico que codifica una proteína quimérica que comprende una región de unión a ligando multimérico y un polipéptido de caspasa-9 o un polipéptido de caspasa-9 modificado, en donde el polipéptido de caspasa-9 o un polipéptido de caspasa-9 modificado comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la Id. de sec. n.º 9; trasplantar las células terapéuticas transducidas o transfectadas al sujeto; y después del trasplante, administrar al sujeto una cantidad eficaz de un ligando multimérico que se une a la región de unión del ligando multimérico, en donde menos del 80 % de las células terapéuticas trasplantadas que expresan el polipéptido de caspasa-9 o el polipéptido de caspasa-9 modificado se eliminan después de administrar el ligando multimérico; en donde el polipéptido de caspasa-9 modificado tiene una curva de respuesta a la dosis de CI_{50} reducida y/o alargada en respuesta al ligando multimérico, cuando se compara con un polipéptido de caspasa-9 que no está modificado. Las células terapéuticas pueden seleccionarse del grupo que consiste en hemocitoblastos, células precursoras inducibles (iPS), embriocitoblastos (ES), citoblastos mesenquimales, células plasmáticas (B), miocitos, linfocitos infiltrados tumorales y linfocitos T. El sujeto puede haberse sometido a un trasplante de citoblastos, por ejemplo, un trasplante que es haploideéntico, coincidente no relacionado, o coincidente relacionado. El sujeto puede haber sido diagnosticado con una enfermedad hiperproliferativa. El sujeto puede haber sido diagnosticado con una enfermedad inmunitaria.

El polipéptido de caspasa-9 modificado puede comprender una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las variantes de caspasa de la Tabla 3. El polipéptido de caspasa-9 modificado puede comprender una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en N405Q, F404Y, F406L, F406T, F404W, y el polipéptido de caspasa-9 que contiene la sustitución de los restos del dominio de dimerización 402-406 (GCFNF) de caspasa-9 por los restos de la posición equivalente de la caspasa-10 (GCFNF⁴⁰²ISAQT). El polipéptido de caspasa-9 modificado puede comprender una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en D330A y T317A. El polipéptido de caspasa-9 modificado puede comprender una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo de que consiste de T317S, S144A, S144D, S196A, S183A, y S195A, el polipéptido de caspasa-9 modificado puede comprender una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de D330A-N405Q, D330A-S144A, D330A-S144D, D330A-S196A, D330A-T317A, y D330A-S183A, el polipéptido de caspasa-9 modificado puede comprender una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste de F404T, F404W, N405F, y F406T, el polipéptido de caspasa-9 modificado puede comprender una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste de D315A, A316G, T317S, F319W, y S307A, el polipéptido de caspasa-9 modificado puede comprender una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste de Y153A e Y153F, el polipéptido de caspasa-9 modificado puede comprender una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo

que consiste de C403S, C403T, C403, N405A, N406A, N406Y, y F406W, el polipéptido de caspasa-9 modificado puede comprender una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste de T317A, T317C, F318A, F319A, y el polipéptido de caspasa-9 que contiene la sustitución de restos de aminoácidos de la caspasa 9 por los restos de la posición equivalente de Caspasa-10 (⁴⁰² ISAQT), y el polipéptido de caspasa-9 que contiene la sustitución de restos de aminoácidos de la caspasa-9 por la posición equivalente de Smac/DIABLO (ATPF³¹⁶AVPI), el polipéptido de caspasa-9 modificado puede comprender una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste de N405T, S317E, y D330A-N405T, el polipéptido de caspasa-9 modificado puede comprender una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste de F319W, F404Y, A316G, Y153A, F406L, C403A, N405Q, F406T, y el polipéptido de caspasa-9 que contiene la sustitución de los restos de aminoácidos 402-406 (GCFNF) del dominio de dimerización de la caspasa por los restos de la posición equivalente de la Caspasa-10 (ISAQT), o el polipéptido de caspasa-9 modificado puede comprender una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste de N405Q, F404W, F404Y, y F406T.

También se describen métodos para controlar la supervivencia de las células terapéuticas trasplantadas en un sujeto, que comprenden preparar o obtener células terapéuticas; transfectar o transducir a un primer subgrupo de las células terapéuticas un ácido nucleico que codifica una proteína quimérica que comprende una región de unión a ligando multimérico y un primer polipéptido de caspasa-9, en donde el primer polipéptido de caspasa-9 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la Id. de sec. n.º: 9; transfectar o transducir a un segundo subgrupo de las células terapéuticas un ácido nucleico que codifica una proteína quimérica que comprende una región de unión a ligando multimérico y un segundo polipéptido de caspasa-9, en donde el segundo polipéptido de caspasa-9 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la Id. de sec. n.º: 9; trasplantar las primeras y segundas células terapéuticas transducidas o transfectadas al sujeto; y después del trasplante, administrar al sujeto una cantidad eficaz de un ligando multimérico que se une a la región de unión del ligando multimérico, en donde se destruyen más células terapéuticas que expresan el primer polipéptido de caspasa-9 que de células terapéuticas que expresan el segundo polipéptido de caspasa-9, después de administrar el ligando multimérico.

El primer polipéptido de caspasa-9 puede tener una curva de respuesta a la dosis de CI₅₀ alargada en respuesta al ligando multimérico, cuando se compara con el segundo polipéptido de caspasa-9. Las células terapéuticas pueden seleccionarse del grupo que consiste en hemocitoblastos, células precursoras inducibles (iPS), embriocitoblastos (ES), citoblastos mesenquimales, células plasmáticas (B), miocitos y linfocitos T. El sujeto puede haber sido diagnosticado con una enfermedad hiperproliferativa. El sujeto puede haber sido diagnosticado con una enfermedad inmunitaria. El primer o el segundo polipéptido de caspasa-9 puede comprender una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en F319W, F404Y, A316G, Y153A, F406L, C403A, N405Q, C285A, F406T, o el polipéptido de caspasa-9 puede comprender ISAQT, la correspondiente secuencia de aminoácidos del dominio de dimerización de la Caspasa-10, o el primer o segundo polipéptido de caspasa-9 puede comprender una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de N405Q, C285A y F406T. El segundo polipéptido de caspasa-9 puede tener una CI₅₀ para el ligando multimérico mayor de 0,01 pM, 0,05 pM, 0,1 pM, 0,5 pM, 0,01 nM, 0,05 nM, 0,1 nM, 0,5 nM o 1 nM.

Un nivel terapéuticamente eficaz de las primeras células terapéuticas que comprenden el receptor de antígeno quimérico puede permanecer activo en el sujeto después de administrar el ligando multimérico. Las segundas células terapéuticas pueden ser linfocitos T, por ejemplo, linfocitos T administrados al sujeto después del trasplante de citoblastos. Los linfocitos T se pueden alorreducir antes de su administración al sujeto. Los linfocitos T pueden no haberse alorreducido antes de su administración al sujeto. La segunda célula terapéutica puede comprender un receptor de antígeno quimérico. Las primeras células terapéuticas pueden ser linfocitos T. Las segundas células terapéuticas pueden ser linfocitos T administrados al sujeto después del trasplante de citoblastos. Los linfocitos T se pueden alorreducir antes de su administración al sujeto. Los linfocitos T pueden no haberse alorreducido antes de su administración al sujeto.

Menos del 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 % o 5 % de células terapéuticas trasplantadas que expresan el polipéptido de caspasa-9 o el polipéptido de caspasa-9 modificado pueden destruirse después de administrar el ligando multimérico. El polipéptido de caspasa-9 modificado puede tener una CI₅₀ para el ligando multimérico mayor de 0,01 pM, 0,05 pM, 0,1 pM, 0,5 pM, 0,01 nM, 0,05 nM, 0,1 nM, 0,5 nM o 1 nM. La región de unión a ligando multimérico se puede seleccionar del grupo que consiste en de región de unión a ligando FKBP, región de unión al ligando del receptor de ciclofilina, región de unión al ligando del receptor de esteroides, región de unión al ligando del receptor de ciclofilina y región de unión al ligando del receptor de tetraciclina. La región de unión al ligando puede comprender una secuencia de aminoácidos F_vF_{vis}. El ligando puede ser una molécula pequeña. El ligando puede ser dimérico. El ligando puede ser FK506 dimérico o un análogo similar a FK506 dimérico. El ligando puede ser AP1903 multimérico. El ligando puede ser AP20187 multimérico. Las células pueden ser linfocitos T. La proteína quimérica además puede comprender un marcador polipeptídico. Los métodos pueden también comprender un paso de selección, en donde las células que expresan el marcador se seleccionan para su administración al sujeto. Los métodos pueden también comprender administrar una segunda dosis del ligando multimérico al sujeto, en donde la segunda dosis comprende más ligando multimérico que la primera dosis.

Se pueden administrar múltiples dosis de ligando multimérico al sujeto, con un aumento de los niveles de dosificación entre las múltiples dosis. El aumento de los niveles de dosificación puede aumentar el número de células terapéuticas que se destruyen. La dosis puede aumentarse de 0,01 a 1 mg/kg. Las dosis puede administrarse en incrementos de aproximadamente 15 a 30 minutos. El ligando multimérico se puede administrar usando una bomba de infusión

continua, y la concentración de ligando multimérico se puede incrementar durante la infusión. La concentración de ligando multimérico se puede aumentar hasta que se ha destruido el porcentaje deseado de células terapéuticas. El sujeto puede tener la enfermedad del injerto contra el hospedador y la administración del ligando multimérico mitiga la enfermedad. El sujeto puede ser un ser humano. La célula terapéutica puede comprender un receptor de antígeno quimérico. El sujeto puede presentar síntomas de toxicidad en un órgano no diana antes de administrar el ligando multimérico. El sujeto puede presentar síntomas de síndrome de lisis tumoral (TLS), síndrome de liberación de citoquinas (CRS) o síndrome de activación macrofágica (MAS) antes de administrar el ligando multimérico. La administración del ligando multimérico puede aliviar la toxicidad fuera del órgano o fuera del objetivo. Se proporciona una discusión sobre la toxicidad del órgano no diana en, por ejemplo, Heslop, H.E., Blood 122:853-854 (2013).

La administración del ligando multimérico puede mitigar el síndrome de lisis tumoral (TLS), síndrome de liberación de citoquinas (CRS) o síndrome de activación macrofágica (MAS). Un nivel terapéuticamente eficaz de células terapéuticas que comprenden el receptor de antígeno quimérico puede permanecer activo en el sujeto después de administrar el ligando multimérico.

El paciente puede tener cáncer. El paciente puede tener un tumor sólido. El cáncer puede estar presente en la sangre o médula ósea del paciente. El paciente puede tener una enfermedad hematológica o de la médula ósea. El paciente puede tener un diagnóstico de cualquier dolencia o trastorno que se puede aliviar mediante el trasplante celular de citoblastos. El paciente puede tener un diagnóstico de anemia drepanocítica o leucodistrofia metacromática. El promotor se puede activar en linfocitos T activados. El polipéptido de caspasa-9 puede ser un polipéptido de caspasa-9 truncado o el polipéptido de caspasa-9 carece del dominio de reclutamiento de la caspasa. El paciente puede mostrar uno o más síntomas de Estadio 1, 2, 3, o 4 de la enfermedad del injerto contra el hospedador.

Después de administrar el ligando multimérico, se puede reducir la cantidad de linfocitos T alorreactivos. Los linfocitos T alorreactivos pueden expresar un marcador y CD3. La cantidad de linfocitos T alorreactivos se puede reducir en aproximadamente un 90 % o más después de administrar el ligando multimérico. Después de administrar el ligando multimérico, los linfocitos T del donante pueden sobrevivir en el paciente y pueden expandirse y son reactivos a virus y hongos. Después de administrar el ligando multimérico, los linfocitos T del donante pueden sobrevivir en el paciente y pueden expandirse y son reactivos a las células tumorales del paciente. Los pacientes pueden haber recibido trasplantes de citoblastos haplo-CD34⁺ antes o al mismo tiempo que la administración de linfocitos T del donante.

El polipéptido de caspasa-9 quimérico inducible se puede haber modificado para tener una sensibilidad diferente al inductor de ligando, o tener una actividad basal diferente en la célula transducida o transfectada, cuando se compara con el polipéptido de caspasa-9 natural o polipéptido de caspasa-9 natural que se ha truncado para eliminar el dominio CARD.

Por lo tanto, los métodos de la presente descripción pueden usar polipéptidos quiméricos que comprenden polipéptidos de caspasa-9 modificados, incluidos, por ejemplo, iCasp9 D330A, iCasp9 N405Q e iCasp9 D330A N405Q, que demostraron una actividad de base entre baja e indetectable, con un efecto perjudicial mínimo sobre su Cl₅₀ AP1903 en un ensayo de destrucción sustituto basado en el indicador SEAP.

Se puede proporcionar una célula que comprende un polinucleótido que codifica una proteína quimérica que comprende una región de multimerización y un polipéptido de caspasa-9 modificado, en donde el polipéptido de caspasa-9 modificado comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la Id. de sec. n.º 9, y comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en S144A, S144D, Y153A, Y153F, S183A, S195A, S196A, S196D, S307A, D315A, A316G, T317A, T317C, T317E, T317S, P318A, F319A, F319W, F326K, D327G, D327K, D327R, Q328K, Q328R, L329E, L329G, L329K, D330A, D330E, D330G, D330N, D330S, D330V, A331K, C403A, C403S, C403T, F404T, F404W, F404Y, N405A, N405F, N405Q, N405T, F406A, F406T, F406W, F406Y, G402A, G402I, G402Q, G402Y, C403P, F404A, F404S y F406L. La al menos una sustitución de aminoácidos puede seleccionarse del grupo que consiste en S144A, S144D, Y153A, Y153F, S183A, S195A, S196A, S196D, S307A, D315A, A316G, T317A, T317C, T317E, T317S, P318A, F319A, F319W, F326K, D327G, D327K, D327R, Q328K, Q328R, L329E, L329G, L329K, D330A, D330E, D330G, D330N, D330S, D330V, A331K, C403A, C403S, C403T, F404T, F404W, F404Y, N405A, N405F, N405Q, N405T, F406A, F406T, F406W y F406Y. La al menos una sustitución de aminoácidos puede seleccionarse del grupo que consiste en S144A, S144D, Y153A, Y153F, S183A, S195A, S196A, S196D, S307A, D315A, A316G, T317A, T317C, T317S, P318A, F319A, F319W, L329E, D330A, D330E, D330G, D330N, D330S, D330V, C403A, C403S, C403T, F404T, F404W, F404Y, N405A, N405F, N405Q, N405T, F406A, F406T, F406W y F406Y. La al menos una sustitución de aminoácidos puede ser S144A, S144D, S183A, S195A, S196A, S196D, T317A, T317S, L329E, D330A, D330E, D330G, D330N, D330S, D330V, F404Y, N405Q, F406A, F406W y F406Y. La al menos una sustitución de aminoácidos puede seleccionarse del grupo que consiste en T317S, S144A, S133 y S196D. La al menos una sustitución de aminoácidos puede seleccionarse del grupo que consiste en S183A, S195A, S196A, S196D, T317A, L329E, D330A, D330E, D330G, D330N, D330S, D330V, F404Y, N405Q, F406A, F406W y F406Y. La al menos una sustitución de aminoácidos puede ser D330E. La al menos una sustitución de aminoácidos puede ser N405Q. El polipéptido de caspasa-9 modificado puede comprender al menos dos sustituciones de aminoácidos seleccionados del grupo que

consiste en D330A-N405Q, D330A-S144A, D330A-S144D, D330A-S183A, D330A-S196A, N405Q-S144A, N405Q-S144D, N405Q-S196D, N405Q-T317S, N405Q-S144Aco, N405Q-T317Sco, ⁴⁰²GCFNF⁴⁰⁶ISAQT (CASP-10), ³¹⁶ATPF³¹⁹AVPI (SMAC/Diablo), D330A-N405T, D315A-D330A, D330A-Y153A, D330A-Y153F, D330A-T317E, ⁴⁰²GCFNF⁴⁰⁶CIVSM (CASP-3), ⁴⁰²GCFNF⁴⁰⁶AAAAA, ⁴⁰²GCFNF⁴⁰⁶YCSTL (CASP-2) y ⁴⁰²GCFNF⁴⁰⁶QPTFT (CASP-8). El

5 polipéptido de caspasa-9 modificado puede comprender al menos dos sustituciones de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en D330A-N405Q, D330A-S144A, D330A-S144D, D330A-S183A, D330A-S196A, N405Q-S144A, N405Q-S144D, N405Q-S196D, N405Q-T317S, N405Q-S144Aco, N405Q-T317Sco, ⁴⁰²GCFNF⁴⁰⁶ISAQT (CASP-10), ³¹⁶ATPF³¹⁹AVPI (SMAC/Diablo) y D330A-N405T. El polipéptido de caspasa-9 modificado puede comprender al menos

10 dos sustituciones de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en D330A-N405Q, D330A-S144A, D330A-S144D, D330A-S183A, D330A-S196A, N405Q-S144A, N405Q-S144D, N405Q-S196D, N405Q-T317S, N405Q-S144Aco, N405Q-T317Sco, ⁴⁰²GCFNF⁴⁰⁶ISAQT (CASP-10) y ³¹⁶ATPF³¹⁹AVPI (SMAC/Diablo). El polipéptido de caspasa-9 modificado puede comprender al menos dos sustituciones de aminoácidos seleccionados del grupo que

15 consiste en D330A-N405Q, D330A-S144A, D330A-S144D, D330A-S183A, D330A-S196A, N405Q-S144A, N405Q-S144D, N405Q-S196D, N405Q-T317S, N405Q-S144Aco, N405Q-T317Sco y ⁴⁰²GCFNF⁴⁰⁶ISAQT (CASP-10). El polipéptido de caspasa-9 modificado puede comprender al menos dos sustituciones de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en N405Q-S144Aco y N405Q-T317Sco. La al menos una sustitución de aminoácidos puede

20 seleccionarse del grupo que consiste en S144A, S144D, Y153A, Y153F, S183A, S195A, S196A, S307A, D315A, A316G, T317A, T317C, T317E, T317S, P318A, F319A, F319W, F326K, D327G, D327K, D327R, Q328K, Q328R, L329E, L329G, L329K, D330A, D330E, D330G, D330N, D330S, D330V, A331K, F404T, F404W, F404YN405F, N405Q y F406T. La al menos una sustitución de aminoácidos puede seleccionarse del grupo que consiste en S144A, S144D, Y153A, Y153F, S183A, S195A, S196A, S307A, D315A, A316G, T317A, T317C, T317E, T317S, P318A, F319A, F319W, F326K, D327G, D327K, D327R, Q328K, Q328R, L329E, L329G, L329K, D330A, D330E, D330G, D330N, D330S, D330V, A331K, F404T, F404W, F404Y, N405F, N405Q y F406T. La al menos una sustitución de aminoácidos

25 puede seleccionarse del grupo que consiste en S144A, S144D, Y153A, Y153F, S183A, S195A, S196A, S307A, D315A, A316G, T317A, T317C, T317E, T317S, P318A, F319A, F319W, L329E, D330A, D330E, D330G, D330N, D330S, D330V, F404T, F404W, F404Y, N405F, N405Q y F406T. La al menos una sustitución de aminoácidos puede seleccionarse del grupo que consiste en S144A, S144D, Y153A, Y153F, S183A, S195A, S196A, S307A, D315A, A316G, T317A, T317C, T317E, T317S, P318A, F319A, F319W, D330A, F404T, F404W, F404Y, N405F, N405Q y F406T. La al menos una sustitución de aminoácidos puede

30 seleccionarse del grupo que consiste en S144A, S144D, S183A, S195A, S196A, T317A, T317S, D330A, F404Y y N405Q. La al menos una sustitución de aminoácidos puede seleccionarse del grupo que consiste en S196D, T317C, T317E, P318A, F319A, F326K, D327G, D327K, D327R, Q328K, Q328R, L329E, L329G, L329K, D330E, D330G, D330N, D330S, D330V, A331K, C403A, C403S, C403T, N405A, N405T, F406A, F406W, F406Y, G402A, G402I, G402Q, G402Y, C403P, F404A, F404S y F406L. La al menos una sustitución de aminoácidos puede seleccionarse del

35 grupo que consiste en S196D, T317C, T317E, P318A, F319A, F326K, D327G, D327K, D327R, Q328K, Q328R, L329E, L329G, L329K, D330E, D330G, D330N, D330S, D330V, C403A, C403S, C403T, N405A, N405T, F406A, F406W y F406Y. La al menos una sustitución de aminoácidos puede seleccionarse del grupo que consiste en S196D, T317C, P318A, F319A, L329E, D330E, D330G, D330N, D330S, D330V, C403A, C403S, C403T, N405A, F406A, F406T, F406W y F406Y. La al menos una sustitución de aminoácidos puede seleccionarse del grupo que consiste en S196D, L329E, D330E, D330G, D330N, D330S, D330V, F406A, F406W y F406Y. 47. La al menos una sustitución de aminoácidos puede seleccionarse del grupo que

40 consiste en N405Q, F404Y, F406A, F406W, F406Y, F404T, F404W, N405F, F406T, C403A, C403S, C403T, N405A y N405T. La al menos una sustitución de aminoácidos puede seleccionarse del grupo que consiste en N405Q, F404Y, F406A, F406W y F406Y. La al menos una sustitución de aminoácidos puede seleccionarse del grupo que consiste en

45 T317S, D330A, D330E, D330G, D330N, D330S, D330V, L329E, T317A, D315A, A316G, T317C, P318A, F319A, T317E, F326K, D327G, D327K, D327R, Q328K, Q328R, L329G, L329K y A331K. La al menos una sustitución de aminoácidos puede seleccionarse del grupo que consiste en T317S, D330A, D330E, D330G, D330N, D330S, D330V, L329E y T317A. La al menos una sustitución de aminoácidos puede seleccionarse del grupo que consiste en S144A, S144D, S196D, S183A, S195A, S196A, Y153A, Y153F y S307A.

50 El polinucleótido puede comprender codones optimizados que codifican el polipéptido de caspasa-9 y, además, el polinucleótido que codifica el polipéptido de caspasa-9 modificado puede comprender una sustitución de aminoácidos de N405Q y comprende codones optimizados. El polinucleótido que codifica el polipéptido de caspasa-9 modificado puede comprender la secuencia de ácidos nucleicos de la Id. de sec. n.º: 39.

55 Además, se proporcionan polipéptidos de caspasa modificados que comprenden las secuencias de aminoácidos descritas en la presente memoria como parte de las células que comprenden polinucleótidos que codifican los polipéptidos de caspasa-9 modificados quiméricos. También se proporcionan ácidos nucleicos que comprenden polinucleótidos que codifican polipéptidos de caspasa-9 modificados y los polipéptidos de caspasa-9 modificados quiméricos. También se proporcionan vectores que comprenden los polinucleótidos que codifican polipéptidos de caspasa modificados y los polipéptidos de caspasa modificados quiméricos.

60 La célula puede ser una célula humana. La célula de la presente descripción 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 precursora. La célula puede ser una célula precursora hematopoyética. La célula se puede seleccionar del grupo que consiste en células del estroma mesenquimal, embriocitoblastos, y citoblastos 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.

5 En algunos aspectos, el polinucleótido que codifica el polipéptido quimérico o polipéptido de caspasa-9 modificado está operativamente unido a un promotor. El promotor puede estar regulado por el desarrollo y el polipéptido de caspasa-9 puede expresarse en células con diferenciación en su desarrollo. El promotor puede ser específico de tejido y el polipéptido de caspasa-9 puede expresarse en el tejido específico. El promotor se puede activar en linfocitos T activados. El promotor puede comprender una secuencia de LTR en 5'. La proteína quimérica además puede comprender un polipéptido marcador, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, un polipéptido Δ CD19. 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 la caspasa.

15 La región de multimerización se puede seleccionar del grupo que consiste en FKBP, receptor de ciclofilina, receptor de esteroides, receptor de tetraciclina, subunidad de cadena pesada de anticuerpo, subunidad de cadena ligera de anticuerpo, 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 multimerización puede ser una región FKBP12. La región FKB12 puede ser una región FKB12_{v36}. La región de multimerización puede ser FvFvls. La región de multimerización puede unirse a un ligando seleccionado del grupo que consiste en un dímero de FK506 y un ligando análogo de FK506 dimérico. El ligando puede ser AP1903, o el ligando puede ser AP20187. La región de multimerización puede tener una secuencia de aminoácidos de la Id. de sec. n.º: 29 o un fragmento funcional de la misma. La región de multimerización puede estar codificada por una secuencia de nucleótidos de la Id. de sec. n.º: 30 o un fragmento funcional de la misma. La región de multimerización puede también comprender un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la Id. de sec. n.º: 32 o un fragmento funcional de la misma. La región de multimerización puede también comprender un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos de la Id. de sec. n.º: 31 o un fragmento funcional de la misma. La región de multimerización puede también comprender un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la Id. de sec. n.º: 32 o un fragmento funcional de la misma. La región de multimerización puede también comprender un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos de la Id. de sec. n.º: 31 o un fragmento funcional de la misma. La región de multimerización puede también comprender un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la Id. de sec. n.º: 29 o de la Id. de sec. n.º: 32 o un fragmento funcional de la misma. La región de multimerización puede también comprender un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos de la Id. de sec. n.º: 30 o de la Id. de sec. n.º: 31 o un fragmento funcional de la misma.

35 En algunos aspectos de la presente descripción, las células se transducen o transfectan con un vector vírico. El vector vírico puede ser, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, un vector retrovírico, tal como, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, un vector del virus de la leucemia murina; un vector SFG; y vector adenovírico, o un vector lentivírico.

40 En algunos aspectos, las células se transfectan o transducen además con un vector de expresión génica. Las células pueden también comprender un polinucleótido que codifica el polipéptido de caspasa-9 modificado y comprender además un segundo polinucleótido heterólogo que codifica un polipéptido heterólogo. El polipéptido heterólogo puede ser un receptor de antígeno quimérico. Las células pueden también comprender un polinucleótido que codifica una proteína quimérica que comprende una región de multimerización y un polipéptido de caspasa-9 o un segundo polipéptido de caspasa-9 modificado, en donde el primer y el segundo polipéptidos de caspasa-9 comprenden diferentes secuencias de aminoácidos y tienen diferentes actividades basales o diferentes valores de la CI₅₀. En algunos aspectos se proporciona una célula, en donde el polipéptido de caspasa-9 modificado y el polipéptido de caspasa-9; o el polipéptido de caspasa-9 modificado y el segundo polipéptido de caspasa-9 modificado tienen diferentes valores de la CI₅₀ o diferentes curvas de respuesta a la dosis alargadas o diferentes valores de la CI₅₀ y diferentes curvas de respuesta a la dosis alargadas al ligando multimérico.

50 La célula puede estar aislada. La célula puede estar en un ser humano. La célula se puede trasplantar a un sujeto humano.

55 También se describen en la presente memoria métodos para administrar linfocitos T de donantes a un paciente humano, que comprenden administrar cualesquiera de las células de la presente descripción a un paciente humano, en donde las células son linfocitos T de un donante humano. Las células se pueden transducir o transfectar en un cultivo de células del donantes. El método puede también comprender detectar la presencia de la enfermedad del injerto contra el hospedador en el paciente después de administrar las células al paciente; y administrar un ligando multimérico que se une a la región de multimerización del paciente en el que se ha detectado la presencia de enfermedad del injerto contra el hospedador. El efecto de la enfermedad del injerto contra el hospedador puede reducirse después de administrar el ligando multimérico.

60 Además, en la presente descripción se describen métodos para el trasplante de citoblastos, que comprenden administrar un trasplante de citoblastos a un paciente humano; y administrar las células de la presente descripción al paciente, en donde las células son linfocitos T de donante s, al paciente. El trasplante de citoblastos se puede seleccionar del grupo que consiste en un trasplante coincidente, un trasplante parcialmente coincidente, un trasplante de células con haplotipo idéntico y un trasplante de citoblastos con haplotipo idéntico CD34⁺. Las linfocitos T del donante humano pueden ser coincidentes, parcialmente coincidentes, o haploidénticos a los linfocitos T del paciente.

También se describen en la presente memoria métodos para controlar la supervivencia de células terapéuticas trasplantadas a un paciente, que comprenden administrar células de la presente descripción a un paciente humano, y administrar un ligando multimérico al paciente, en donde el ligando multimérico se une a la región de multimerización, en donde las células administradas que expresan el polipéptido de caspasa-9 se destruyen después de administrar el ligando multimérico. El método puede comprender preparar las células de la presente descripción para su trasplante y trasplantar las células terapéuticas al paciente humano.

El paciente puede tener cáncer. El paciente puede tener un tumor sólido. El cáncer puede estar presente en la sangre o médula ósea del paciente. El paciente puede tener una enfermedad hematológica o de la médula ósea. El paciente puede tener un diagnóstico de cualquier dolencia o trastorno que se puede aliviar mediante el trasplante celular de citoblastos.

Los métodos de la presente descripción pueden también comprender una etapa de selección, en donde las células que expresan un marcador se seleccionan para su administración al paciente. El marcador puede ser, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, Δ CD19. Las células se pueden transfectar a un cultivo de células del donante que se prepara a partir de una muestra de médula ósea. Las células se pueden transfectar a un cultivo de células del donante que se prepara a partir de sangre periférica. El cultivo de células del donante se puede preparar a partir de células mononucleares de sangre periférica del donante. Los linfocitos T del donante pueden haberse alorreducido del cultivo de células del donante antes de la transfección o transducción. Los linfocitos T del donante pueden no haberse alorreducido del cultivo de células del donante antes de la transfección o transducción. Los linfocitos T transducidos o transfectados se pueden cultivar en presencia de IL-2 antes de su administración al paciente.

Los métodos de la presente descripción pueden también comprender administrar un ligando multimérico que se une a la región de multimerización, tal como, por ejemplo, AP1903 o AP20187. El ligando multimérico se puede administrar para tratar la enfermedad del injerto contra hospedador. El paciente puede presentar síntomas de la enfermedad del injerto contra el hospedador antes de administrar el ligando multimérico. El paciente puede mostrar uno o más síntomas de Estadio 0, Estadio 1, Estadio 2, Estadio 3 o Estadio 4 de la enfermedad del injerto contra el hospedador.

En ciertos aspectos de los métodos, puede administrarse más de una dosis del ligando multimérico. Después de administrar el ligando multimérico, se puede reducir la cantidad de linfocitos T alorreactivos. Los linfocitos T alorreactivos pueden expresar el marcador y CD3. La cantidad de linfocitos T alorreactivos se puede reducir en aproximadamente un 90 % o más después de administrar el ligando multimérico. Después de administrar el ligando multimérico, los linfocitos T del donante pueden sobrevivir en el paciente y pueden expandirse y son reactivos a virus y hongos. Después de administrar el ligando multimérico, los linfocitos T del donante pueden sobrevivir en el paciente y pueden expandirse y son reactivos a las células tumorales del paciente.

Los pacientes pueden haber recibido trasplantes de citoblastos antes o al mismo tiempo que la administración de linfocitos T del donante. El trasplante de citoblastos puede ser de haplotipo idéntico. Los linfocitos T del donante pueden ser de haplotipo idéntico y es posible que no se hayan alorreducido antes de administrarse al sujeto.

Se pueden administrar al paciente al menos 1×10^6 linfocitos T del donante transducidos o transfectados. Se pueden administrar al paciente al menos 1×10^7 linfocitos T del donante transducidos o transfectados. Se pueden administrar al paciente al menos 1×10^8 linfocitos T del donante transducidos o transfectados.

Puede proporcionarse un tratamiento personalizado en donde el estadio o nivel de la enfermedad o dolencia se determina antes de administrar el ligando multimérico, antes de administrar una dosis adicional del ligando multimérico, o al determinar el método y la dosificación involucrada en la administración del ligando multimérico. Estos métodos pueden usarse en cualquiera de los métodos de cualquiera de las enfermedades o dolencias de la presente descripción. Cuando estos métodos para evaluar el paciente antes de administrar el ligando se discuten en el contexto de la enfermedad del injerto contra el hospedador, se entiende que estos métodos pueden aplicarse de manera similar al tratamiento de otras dolencias y enfermedades. Así, por ejemplo, el método puede comprender administrar células terapéuticas a un paciente, y puede también comprender identificar una presencia o ausencia de una dolencia en el paciente que requiera la eliminación de las células terapéuticas transfectadas o transducidas del paciente; y administrar un ligando multimérico que se une a la región de multimerización, manteniendo una dosificación posterior del ligando multimérico, o el ajuste de una dosificación posterior del ligando multimérico al paciente dependiendo de la presencia o ausencia de la dolencia identificada en el paciente. Y, por ejemplo, el método puede también comprender determinar si administrar una dosis adicional o dosis adicionales del ligando multimérico al paciente dependiendo de la aparición de síntomas de la enfermedad del injerto contra el hospedador en el paciente. El método puede también comprender identificar la presencia, ausencia o estadio de la enfermedad del injerto contra el hospedador en el paciente, y administrar un ligando multimérico que se une a la región de multimerización, manteniendo una dosificación posterior del ligando multimérico, o ajustar una dosificación posterior del ligando multimérico al paciente dependiendo de la presencia, ausencia o estadio de la enfermedad del injerto contra el hospedador identificada en el paciente. El método puede también comprender identificar la presencia, ausencia o estadio de la enfermedad del injerto contra el hospedador en el paciente, y determinar si se deberá administrar al paciente un ligando multimérico que se une a la región de multimerización, o la dosificación del ligando multimérico que se administra posteriormente al paciente se ajusta dependiendo de la presencia, ausencia o estadio

de la enfermedad del injerto contra el hospedador identificada en el paciente. El método puede también comprender recibir información que comprende la presencia, ausencia o estadio de la enfermedad del injerto contra el hospedador en el paciente; y administrar un ligando multimérico que se une a la región de multimerización, manteniendo una dosificación posterior del ligando multimérico, o el ajuste de una dosificación posterior del ligando multimérico al paciente dependiendo de la presencia, ausencia o estadio de la enfermedad del injerto contra el hospedador identificada en el paciente. El método puede también comprender identificar la presencia, ausencia o estadio de la enfermedad de injerto contra el hospedador en el paciente, y transmitir la presencia, ausencia o estadio de la enfermedad de injerto contra el hospedado a la persona encargada de tomar la decisión de administrar un ligando multimérico que se une a la región de multimerización, que mantiene una dosificación posterior del ligando multimérico, o que ajusta una dosificación posterior del ligando multimérico al paciente dependiendo de la presencia, ausencia o estadio de la enfermedad del injerto contra el hospedador identificada en el paciente. El método puede también comprender identificar la presencia, ausencia o estadio de la enfermedad del injerto contra el hospedador en el paciente, y transmitir una indicación para administrar un ligando multimérico que se une a la región de unión multimérica, mantener una dosificación posterior del ligando multimérico administrado al paciente dependiendo de la presencia, ausencia o estadio de la enfermedad del injerto contra el hospedador identificada en el paciente.

En algunos aspectos, también se describen en la presente memoria métodos para tratar la enfermedad del injerto contra el hospedador en un paciente que se ha sometido a una terapia celular, en donde una o más de las células introducidas para la terapia es una célula de la presente descripción, que comprende administrar al paciente un ligando multimérico que se une a la región de multimerización. Después de administrar el ligando multimérico que se une a la región de unión multimérica, puede reducirse el número de linfocitos T alorreactivos. Se reducen los linfocitos T alorreactivos que pueden no estar experimentando división celular. En las 2 horas posteriores a la administración del ligando multimérico, se puede disminuir al menos un 90 % de las células $\Delta\text{CD19}^+ \text{CD3}^+$. En 1 hora posterior a la administración del ligando multimérico, se puede disminuir al menos un 90 % de las células $\Delta\text{CD19}^+ \text{CD3}^+$. En los 30 minutos posteriores a la administración del ligando multimérico, se puede disminuir al menos un 90 % de las células $\Delta\text{CD19}^+ \text{CD3}^+$. En las 24 horas posteriores a la administración del ligando multimérico, puede producirse una reducción logarítmica adicional de células $\text{CD3}^+\Delta\text{CD19}^+$ en comparación con la cantidad de células $\text{CD3}^+\Delta\text{CD19}^+$ a los 30 minutos posteriores a la administración del ligando multimérico. El método puede también comprender una resolución de GvHD en la piel y el hígado en las 24 horas posteriores a la administración del ligando multimérico.

Las células pueden ser células terapéuticas y pueden estar transducidas o transfectadas con un segundo ácido nucleico que codifica una segunda proteína heteróloga. Las células terapéuticas se pueden transducir con un gen heterólogo que expresa un receptor de antígeno quimérico. Las células terapéuticas se pueden transducir con un gen heterólogo que expresa un receptor TGF-beta modificado. Las células terapéuticas se pueden transducir con el gen heterólogo antes, al mismo tiempo, o después de transducirse con el ácido nucleico que codifica la proteína quimérica que comprende una región de multimerización y un polipéptido de caspasa-9.

También se proporciona un método para administrar linfocitos T del donante a un paciente humano, que comprende administrar un linfocito T transducido o transfectado de la presente descripción a un paciente humano, en donde las células son linfocitos T no alorreducidos.

Las células terapéuticas pueden administrarse a un sujeto que tenga un trastorno no neoplásico, o donde el sujeto tiene un diagnóstico de un trastorno no neoplásico, tales como, por ejemplo, un trastorno de inmunodeficiencia primaria (por ejemplo, aunque no de forma limitativa, inmunodeficiencia combinada grave (SCID), inmunodeficiencia combinada (CID), defecto/deficiencia congénita de linfocitos T, inmunodeficiencia variable común (CVID), enfermedad granulomatosa crónica, IPEX (inmunodeficiencia, poliendocrinopatía, enteropatía, vinculada al cromosoma X) o de tipo IPEX, síndrome de Wiskott-Aldrich, deficiencia de ligando CD40, deficiencia de adherencia leucocitaria, deficiencia de DOCK 8, deficiencia de IL-10/deficiencia del receptor de IL-10, deficiencia de GATA-2, enfermedad linfoproliferativa vinculada al cromosoma X (XLP), hipoplasia del cartílago piloso y similares, hemofagocitosis linfohistiocitosis (HLH) u otros trastornos hemofagocíticos, trastornos por fallo de la médula ósea heredados (tales como, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, síndrome de Shwachman-Diamond, anemia de Diamond-Blackfan, disqueratosis congénita, anemia de Fanconi, neutropenia congénita, y similares), hemoglobinopatías (tales como, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, enfermedad drepanocítica, talasemia, y similares), trastornos metabólicos (tales como, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, mucopolisacaridosis, esfingolipidosis, y similares), o un trastorno osteoclástico (tales como, por ejemplo, aunque no de forma limitativa osteopetrosis).

Las células terapéuticas pueden ser, por ejemplo, cualquier célula administrada a un paciente para obtener un resultado terapéutico deseado. Las células pueden ser, por ejemplo, linfocitos T, linfocitos citolíticos naturales, linfocitos B, macrófagos, células de sangre periférica, células precursoras hematopoyéticas, células de médula ósea o células tumorales. El polipéptido de caspasa-9 modificado también puede utilizarse para destruir directamente las células tumorales. En una aplicación, los vectores que comprenden los polinucleótidos que codifican el polipéptido de caspasa-9 modificado inducible se inyectarían en un tumor y después de 10-24 horas (para permitir la expresión de proteínas), se administraría el inductor de ligando, tal como, por ejemplo, AP1903, para producir la apoptosis, produciendo la liberación de antígenos tumorales al microentorno. Para mejorar además el microentorno del tumor para que sea más inmunógeno, el tratamiento se puede combinar con uno o más adyuvantes (por ejemplo, IL-12, TLR, inhibidores de IDO, etc.). Las células se pueden administrar para tratar

un tumor sólido, tal como, por ejemplo, administración de las células a un lecho tumoral. Un polinucleótido que codifica el polipéptido de caspasa-9 quimérico puede administrarse como parte de una vacuna o mediante la administración directa a un lecho tumoral, dando como resultado la expresión del polipéptido de caspasa-9 quimérico en las células tumorales, seguido de apoptosis de las células tumorales después de administrar el inductor de ligando. Los métodos para destruir células tumorales in vivo usando terapia de ADN y vacunas intratumorales se analiza en, por ejemplo, Xie X. y col., *Cancer Res* 61, 6795-6804 (2001) y en Nikitina, E., y col., *Cancer Res* 65: 4309-4319 (2005). Por lo tanto, se describen también en la presente memoria 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 descripción. La vacuna puede administrarse a un sujeto, transformando o transduciendo de esta forma las células diana in vivo. El inductor de ligando se administra después siguiendo los métodos de la presente descripción.

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 la caspasa. El polipéptido de caspasa-9 puede comprender la secuencia de aminoácidos de la Id. de sec. n.º: 9 o un fragmento de la misma, o puede estar codificado mediante la secuencia de nucleótidos con Id. de sec. n.º: 8 o un fragmento de la misma.

Los métodos pueden también comprender administrar un ligando multimérico que se une a la región de unión a ligando multimérico. La región de unión a ligando multimérico se puede seleccionar del grupo que consiste en FKBP, receptor de ciclofilina, receptor de esteroides, receptor de tetraciclina, subunidad de cadena pesada de anticuerpo, subunidad de cadena ligera de anticuerpo, 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 FK506 dimérico o un ligando análogo similar a FK506 dimérico ligando. El ligando puede ser AP1903 multimérico. El ligando multimérico se puede administrar para tratar la enfermedad del injerto contra hospedador. El paciente puede presentar síntomas de la enfermedad del injerto contra el hospedador antes de administrar el ligando multimérico. El paciente puede presentar uno o más síntomas de Estadio 0 de la enfermedad del injerto contra el hospedador. El paciente puede presentar uno o más síntomas de Estadio 1 de la enfermedad del injerto contra el hospedador. El paciente puede presentar uno o más síntomas de Estadio 2 de la enfermedad del injerto contra el hospedador. El paciente puede presentar uno o más síntomas de Estadio 3 de la enfermedad del injerto contra el hospedador. El paciente puede presentar uno o más síntomas de Estadio 4 de la enfermedad del injerto contra el hospedador. Puede administrarse más de una dosis del ligando multimérico. Después de administrar el ligando multimérico, se puede reducir la cantidad de linfocitos T alorreactivos. El número de linfocitos T alorreactivos se puede reducir de aproximadamente 60 % a 99 %, de aproximadamente 70 % a 95 %, de 80 % a 90 % o aproximadamente un 90 % o más después de administrar el ligando multimérico. Después de administrar el ligando multimérico, los linfocitos T del donante pueden sobrevivir en el paciente y pueden expandirse y son reactivos a virus y hongos. Después de administrar el ligando multimérico, los linfocitos T del donante pueden sobrevivir en el paciente y pueden expandirse y son reactivos a las células tumorales del paciente.

Ciertos aspectos se describen con más detalle en la siguiente descripción, ejemplos, reivindicaciones y figuras.

Breve descripción de los dibujos

Los dibujos ilustran aspectos de la tecnología descrita en la presente memoria. Para mayor claridad y facilidad de ilustración, los dibujos no están hechos a escala y, en algunos casos, varios aspectos se pueden mostrar exagerados o agrandados para facilitar la comprensión de aspectos particulares.

La Fig. 1A ilustra diversos vectores de expresión iCasp9 según se describe en la presente memoria. La Fig. 1B ilustra una transferencia Western representativa de la proteína caspasa-9 de longitud completa o truncada producida por los vectores de expresión que se muestran en la Fig. 1A.

Las Figs. 2A-2D presentan gráficamente resultados de experimentos realizados para evaluar el efecto de la expresión de las construcciones iCasp9 sobre el fenotipo de células transducidas con diversos vectores de expresión iCasp9. La Fig. 2A ilustra niveles de marcadores de la superficie celular en células transducidas y no transducidas. La Fig. 2B ilustra niveles de secreción de citoquinas de tipo Th1 y Th2 tras la estimulación con antígeno en las células transducidas y no transducidas. La Fig. 2C ilustra niveles de actividad citolítica contra una línea de linfocitos B autólogos linfoblastoide transformada con EVB (LCL), LCL con emparejamiento incorrecto de HLA y HSB-2 en células transducidas y no transducidas. La Fig. 2D ilustra la persistencia de la dependencia del antígeno en líneas de células transducidas con iCasp9. Obsérvese que la disminución constante de linfocitos T después de la estimulación con antígeno se interrumpe. En los ejemplos se presenta un análisis adicional de las condiciones experimentales y los resultados.

Las Figs. 3A-3D ilustran los resultados de varios experimentos realizados para determinar la eficacia de un inducción de dimerización químico (CID) en células que expresan construcciones de expresión iCasp9. La Fig. 3A ilustra gráficos FACS de células después del tratamiento con CID o portador. Las gráficas FACS se presentan para células no seleccionadas (fila superior de la Fig. 3A) y células seleccionadas según una elevada expresión de GFP (fila inferior de la Fig. 3A). La Fig. 3B ilustra los resultados de tratar con CID durante la noche células transducidas con iCasp9. El panel tratado muestra células que presentan características de la apoptosis. La Fig. 3C ilustra los resultados de células tratadas con CID y

células no tratadas teñidas con anexina V y 7-AAD. La Fig. 3D muestra una curva de respuesta a la dosis para el CID AP20187. En los ejemplos se presenta un análisis adicionales de las condiciones experimentales y los resultados.

5 Las Figs. 4A-4C muestran los resultados de varios experimentos realizados para medir la correlación entre el nivel de expresión transgénica y el funcionamiento de icasp9. La Fig. 4A muestra los resultados de la selección de la población de células según la expresión de GFP. La Fig. 4B ilustra los resultados de células tratadas durante la noche con CID y teñidas para anexina V y 7-AAD. La Fig. 4C muestra los resultados de linfocitos T seleccionados que se mezclaron 1:1 con linfocitos T no transducido se incubaba con CID 10 nM después de la estimulación antigénica.- Se indica el porcentaje de linfocitos T positivos para GFP residual en el día 7. En los ejemplos se presenta un análisis adicional de las condiciones experimentales y los resultados.

15 Las Figs. 5A-5C ilustran los resultados de varios experimentos que comparan la funcionalidad de iFas e iCasp9 en linfocitos T. La Fig. 5A ilustra los resultados de células transducidas con una construcción de expresión iFas o iCasp9 y clasificadas según la expresión de GFP. La Fig. 5B ilustra los resultados de mediciones de la expresión de GFP después del tratamiento con CID. La Fig. 5C muestra los resultados de los estudios de expresión realizados en las líneas de células Jurkat y MT 2 derivadas de ser humano. Las líneas celulares se tiñeron con anexina V y 7-AAD. En los ejemplos se presenta un análisis adicionales de las condiciones experimentales y los resultados.

20 La Fig. 6 ilustra gráficamente el funcionamiento de iCasp9 cuando se expresa simultáneamente con Il-2.

La Fig. 7 ilustra gráficamente el funcionamiento de iCasp9 in vivo. En los ejemplos se presenta un análisis adicionales de las condiciones experimentales y los resultados.

25 La Fig. 8A ilustra la estructura de la construcción de expresión de iCasp9, SFG.iCasp9.2A.ΔCD19. La Fig. 8B ilustra el protocolo usado para producir la expresión del producto celular iCasp9 en células alorreducidas. En los ejemplos se presenta un análisis adicionales de las condiciones experimentales y los resultados.

La Fig. 9 ilustra gráficamente que las células alorreducidas se expanden correctamente después de la transducción.

30 La Fig. 10 muestra que las células transducidas con el gen de la construcción suicida podrían enriquecerse hasta alta pureza mediante selección inmunomagnética con CD19. En los ejemplos se presenta un análisis adicionales de las condiciones experimentales y los resultados.

35 Las Figs. 11A-11C Ilustran los resultados de varios experimentos realizados para mostrar que las células modificadas alorreducidas retienen su repertorio antivírico y su funcionalidad. La Fig. 11A muestra la secreción de interferón- γ en respuesta a antígenos víricos, según se evalúa mediante ELISpot. La Fig. 11B muestra los resultados de un ensayo de citotoxicidad después de estimular las células alorreducidas con VEB-LCL. La Fig. 11C Ilustra la frecuencia de linfocitos T específicos de aHLA-B8-RAKFKQLL, un epítipo de un antígeno lítico del VEB (BZLF1).

40 Las Figs. 12A y 12B ilustran los resultados de diversos experimentos realizados para mostrar que se podrían aislar linfocitos T reguladores de células genéticamente modificadas del producto final a pesar de la alorreducción inicial usando la inmunotoxina CD25. La Fig. 12A muestra los niveles de expresión de Foxp3. La Fig. 12B ilustra los resultados del ensayo funcional realizado para mostrar que la adición de células agotadas CD4⁺/CD25⁺ genéticamente modificadas redujo significativamente la proliferación celular. En los ejemplos se presenta un análisis adicional de las condiciones experimentales y los resultados.

50 Las Figs. 13A-13CA y 13CB ilustran los resultados de diversos experimentos realizados para mostrar que las células modificadas genéticamente alorreducidas quedaron rápida y eficazmente eliminadas mediante AP20187, y que la expresión del transgén y la eficacia de destrucción disminuyeron con el cultivo prolongado, y se podría restaurar tras la reactivación de los linfocitos T. La Fig. 13A muestra un análisis FACS representativo de células teñidas con anexina V y 7-AAD. La Fig. 13B ilustra gráficamente los resultados de la reactivación de linfocitos T tras la destrucción cuando se administra AP20187. La Fig. 13CA y 13CB muestran gráficas FACS representativas que muestran el efecto de un cultivo prolongado y la activación de los linfocitos T tras el funcionamiento del gen suicida. En los ejemplos se presenta un análisis adicionales de las condiciones experimentales y los resultados.

55 Las Figs. 14A y 14B ilustran los resultados de diversos experimentos realizados para mostrar que los linfocitos T específicos de virus quedaron parcialmente retenidos después del tratamiento de las células estimuladas con aloantígeno mediante el compuesto dimerizador. La Fig. 14A muestra los resultados de linfocitos T específicos del VEB. La Fig. 14B muestra los resultados de linfocitos T específicos del CMV. Las células se cuantificaron mediante análisis de pentámeros antes de la aloestimulación, después de la aloestimulación y después del tratamiento de las células aloestimuladas con el compuesto dimerizador. En los ejemplos se presenta un análisis adicionales de las condiciones experimentales y los resultados.

65 Las Figs. 15A y 15B ilustran un análisis de células del estroma mesenquimal (MSC) de individuos sanos. La Fig. 15A muestra que la fracción adherente mononuclear aislada de médula ósea era positiva homogéneamente para CD73, CD90 y CD105 y era negativa para marcadores hematopoyéticos. La Fig. 15B ilustra el análisis que

muestra que las células pudieron diferenciarse en otros linajes celulares. En los ejemplos se presenta un análisis adicional de las condiciones experimentales y los resultados.

5 Las Figs. 16A y 16B ilustran los resultados de experimentos realizados para mostrar que las MCM humanas se transforman fácilmente con iCasp9- Δ CD19 y mantienen su fenotipo. La Fig. 16A ilustra que el porcentaje de células CD19 positivas (p. ej., un indicador de la transducción correcta de iCasp9) permanece sustancialmente constante durante más de 2 semanas. La Fig. 16B muestra que las células transducidas y no transducidas retienen el fenotipo de superficie MSC característico. En los ejemplos se presenta un análisis adicional de las condiciones experimentales y los resultados.

10 Las Figs. 17A y 17B ilustran los resultados de experimentos realizados para mostrar que las MCM humanas que expresan iCasp9 se inducen selectivamente hacia la apoptosis después de la exposición al CID. La Fig. 17A muestra los resultados del análisis FACS de células tratadas con CID durante 24 horas. La Fig. 17B muestra los resultados de la purificación magnética de células iCasp9+/CD19. En los ejemplos se presenta un análisis adicional de las condiciones experimentales y los resultados.

15 La Fig. 18 ilustra los resultados de experimentos realizados para determinar la eficacia de la apoptosis e identificar las poblaciones resistentes a la apoptosis.

20 La Fig. 19, paneles A-Q ilustran MSC humanas que expresan iCasp9 teñidas para destacar linajes celulares específicos, mostrando que las células transducidas retienen el potencial de diferenciación de las MSC no modificadas. En los ejemplos se presenta un análisis adicionales de las condiciones experimentales y los resultados.

25 La Fig. 20 ilustra gráficamente que la progenie diferenciada de las MSC humanas que expresan iCasp9 se destruyen por exposición a CID in vitro. Las Figs. 21A-21C ilustran los resultados de experimentos realizados para mostrar que las MCM humanas que expresan iCasp9 se destruyen selectivamente in vivo tras exposición a CID.

30 La Fig. 21A muestra los resultados de obtención de imágenes del animal completo. La Fig. 21 muestra gráficamente el curso temporal de la destrucción de células iCasp9+ después de la exposición a CID. La Fig. 21C muestra los resultados de la exploración en serie de los análisis tras la inoculación subcutánea de MSC. En los ejemplos se presenta un análisis adicionales de las condiciones experimentales y los resultados.

La Fig. 22 muestra cómo el producto del gen suicida y el CID interactúan para producir la apoptosis.

35 La Fig. 23 ilustra una visión general del protocolo usado para la producción de células modificadas con el gen suicida alorreducidas.

La Fig. 24 describe el uso de enriquecimiento inmunomagnético de linfocitos T que expresan iCasp9 de los que se ha eliminado los que tienen el haplotipo no coincidentes.

40 La Fig. 25 ilustra la construcción de expresión, iCasp9- Δ CD19 y el método de transducir células para que hospeden la construcción de expresión. En los ejemplos se presenta un análisis adicionales de las condiciones experimentales y los resultados.

45 La Fig. 26 muestran el efecto de tratar con CID los linfocitos T modificados genéticamente (p. ej., linfocitos que expresan iCasp9).

50 Las Figs. 27A y 27B proporcionan gráficos que muestran la detección de linfocitos T con transducción de iCasp9 en la sangre periférica de pacientes. Fig. 27A: Análisis FACS y Fig. 27B: análisis de ADN, para linfocitos T transducidos con iCasp9 (CD3⁺ CD19⁺, CD4⁺ CD19⁺ o CD8⁺ CD19⁺) de cuatro pacientes que recibieron terapia celular después de un trasplante de haploideénticos para HDL procedentes de una recidiva de leucemia. Los pacientes 1, 2 y 4 desarrollaron GvHD de piel/hígado y recibieron una sola dosis del fármaco dimerizador AP1903.

55 Las Figs. 28 y 29 ilustran gráficamente la expansión del linaje celular de los linfocitos T transducidos con iCasp9, según se indica por los marcadores de la superficie celular.

60 La Fig. 30 proporciona un gráfico y fotografías de la reversión rápida de GvHD después del tratamiento con el fármaco dimerizador AP1903. (A) es un gráfico que representa la normalización de la concentración de bilirrubina en el paciente 1 en las 24 horas posteriores al tratamiento. (B) proporciona fotografías que muestran la desaparición de la erupción cutánea del paciente 2 en las 24 horas posteriores al tratamiento.

Las Figs. 31 y 32 ilustran gráficamente el inicio de la GvHD hepática aguda (grado 2) tras la expansión de los linfocitos T iCasp9. La Fig. 32 también ilustra de forma pictográfica un paciente que presenta síntomas de GVHD.

65 Las Figs. 33-34 muestran la rápida y eficaz eliminación de linfocitos T iCasp9 después de administrar AP1903 (p. ej., el CID) a los pacientes.

Las Figs. 35A-35C proporcionan gráficos que muestran la persistencia de la sensibilidad del fármaco y el funcionamiento antivírico de los precursores CD3⁺/CD19⁺ después del tratamiento con AP1903 in vivo. (A) Los linfocitos T CD3⁺/CD19⁺ permanecen dentro de la población CD3⁺ en la sangre periférica durante 5 meses después del tratamiento con AP1903 (paciente 2). Estos linfocitos CD3⁺/CD19⁺ mantienen la sensibilidad a AP1903 in vitro que se evalúa tanto por reducción del número de linfocitos CD3⁺/CD19⁺ en el análisis FACS y (B) mediante análisis por PCR cuantitativa del gen *icasp9* antes y después de la exposición al fármaco dimerizador. (C) Los linfocitos T CD3⁺/CD19⁺ genéticamente modificados recogidos del paciente 2 fueron sensibles a las mezclas de péptido CMV a los 6 días antes del AP1903, pero no a las mezclas de péptido superviviente del control negativo, como se muestra por la presencia de linfocitos T CD3⁺/CD19⁺ positivos para IFN-gamma en los cultivos estimulados con CMV. La valoración de la población CD3⁺/CD19⁺ en recuperación a 6 y 14 días después de la infusión de AP1903 para tratar la GvHD mostró la persistencia de células específicas de virus en ausencia de GvHD recurrente.

Las Figs. 36-38 ilustran gráficamente que las células *iCasp9*, de las que se han eliminado las que tienen el haplotipo no coincidente, pudieron expandirse después del tratamiento con AP1903 sin signos de GvHD.

La Fig. 37 muestra la reconstitución de linfocitos T no expuestos a tratamiento, de memoria central y efectores después del tratamiento con AP1903.

La Fig. 39 ilustra gráficamente la expansión de los linfocitos T *iCasp9* de los que se han eliminado los de haplotipo no coincidente y la restauración del quimerismo del donante. En los ejemplos se presenta un análisis adicionales de las condiciones experimentales y los resultados.

La Fig. 40 ilustra gráficamente los linfocitos T específicos de virus antes y después de la infusión de linfocitos T.

La Fig. 41 ilustra gráficamente los niveles de producción de IFN- γ intracelular por las PBMC del paciente en respuesta al antígeno de *Aspergillus*.

La Fig. 42 ilustra gráficamente la expansión de los linfocitos T *iCasp9*. En los ejemplos se presenta un análisis adicionales de las condiciones experimentales y los resultados.

La Fig. 43 ilustra gráficamente parte de la construcción de expresión que codifica los polipéptidos *iCaspasa9* quimérico y CD19.

La Fig. 44 ilustra gráficamente una estructura proteica de un polipéptido de caspasa-9. Para modificar la señalización basal, se realizó mutagénesis dirigida al sitio sobre los restos identificados previamente como fundamentales para la homodimerización (G402-C-F-N-F406), proteólisis e interacción con el dominio XIAP-BIR3 (color rosa), el inhibidor de la caspasa-9 (color gris) (D315-A-P-F319, D330-A-I-S-S334), y sitios de fosforilación de la caspasa-9. La cristalografía se basa en el 1nw9 (Banco de Datos de Proteínas RCSB). Se sometieron a ensayo setenta y cinco mutantes de *iCasp9*, y los candidatos prometedores con menor actividad basal incluían S183A, S196D, D330A y N405Q.

La Fig. 45 proporciona un análisis de ensayos SEAP. Para examinar tanto la señalización basal como la actividad inducida por AP1903, 10⁶ células HEK293T/16 de paso temprano se transfectaron simultáneamente con varias cantidades de Caspasa natural y 500 ng de un plásmido de expresión que utiliza un promotor SR α para activar SEAP, un marcador de viabilidad celular. Según las sugerencias del fabricante, se añadió a cada mezcla 1 ml de IMDM con 10 % de FBS sin antibióticos. 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 del sobrenadante a una placa de 96 pocillos y se desnaturalizaron térmicamente a 68 °C durante 30 minutos para inactivar las fosfatasas alcalinas endógenas. Para el ensayo, el sustrato de fosfato de 4-metilumbeliferilo se hidrolizó mediante SEAP a 4-metilumbeliferona, un metabolito que puede excitarse a 364 nm y detectarse con un filtro de emisión de 448 nm. Dado que el SEAP se usa como marcador de la viabilidad celular, una lectura SEAP más baja corresponde a un aumento de actividades *icaspasa-9*. Por lo tanto, una lectura de SEAP más alta en ausencia de AP1903 indicaría menor actividad basal. Los mutantes de caspasa deseados tendrían una señalización basal menor con una mayor sensibilidad (es decir, IC₅₀ inferior) a AP1903. El objetivo del estudio es reducir significativamente la señalización basal sin alterar significativa la CI₅₀.

Las Figs. 46A-46C ilustran gráficamente los datos relacionados con la señalización basal y la señalización inducida por AP1903 de varios polipéptido de caspasa-9 modificados quiméricos. (46A) Ensayo SEAP de células HEK 293/16 transfectadas transitoriamente con 1 μ g de ADN que codifica polipéptidos de caspasa-9 modificados quiméricos y 0,5 μ g de pSH1-kSEAP por millón de células HEK293 72 horas después de la transfección. *iCasp9* D330A, N405Q y el doble mutante D330A-N405Q mostraron, todos ellos, una señalización basal inferior. (46B) Células HEK293/16 transfectadas 2 μ g de ADN que codifica polipéptidos de caspasa-9 modificados quiméricos junto con 0,5 μ g de pSH1-kSEAP por millón de células HEK293. (46C) Resumen de los valores estimados de CI₅₀ para AP1903 de los polipéptidos de caspasa-9 modificados quiméricos. Todas las mutaciones aumentaron negativamente la CI₅₀ hasta AP1903. Los puntos de datos son el promedio de dos pocillos, y los datos mostrados son representativos de dos experimentos independientes.

Las Figs. 47A-47B incluyen fotografías de la transferencia Western que analizan la expresión de proteínas y la proteólisis de polipéptidos de caspasa-9 naturales (no modificados) quiméricos y polipéptidos de caspasa-9 modificados quiméricos. (47A) Transferencia Western de células HEK293T/16 transfectadas transitoriamente con 1 o 2 µg de pSH1-iCasp9 WT, D330A, N405Q, o el doble mutante D330A-N405Q 72 horas después de la transfección. Se cargaron 33 µg de lisados de proteínas por hilera en ambas transferencias. Las transferencias se etiquetaron con una dilución 1:1000 de anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra caspasa-9 humana dirigido a los restos 299-318 de la caspasa-9 humana para detectar los productos tanto no procesados como de la escisión de p30, iCasp9 D330A, N405Q y D330A-N405Q se expresaron en niveles similares o superiores que la iCasp9 natural. (47B) El etiquetado de las transferencias arrastradas con un anticuerpo policlonal dirigido contra actina mostró una cantidad equivalente de proteína cargada en 4A.

La Fig. 48 proporciona un gráfico de una curva de respuesta a las dosis teórica de un polipéptido de caspasa modificado, atenuado y tituable. El lado izquierdo se aproxima a la curva de respuesta a la dosis típica para un polipéptido de caspasa-9 que no está modificado, con una $CI_{50} \sim 10$ pM. El lado derecho muestra un polipéptido de caspasa-9 modificado teórico con una CI_{50} reducida y una curva de respuesta de dosis alargada. Independientemente de la curva de respuesta a la dosis extendida de la CaspaCIDE inducible teórica de la siguiente generación, ambos polipéptidos podrían permitir la eliminación modulada y tituable de células, lo que permite el ajuste dirigido por el médico de la muerte celular, aunque en diferentes intervalos de dosificación.

La Fig. 49 (AB) proporciona los resultados de un estudio de escalado de dosis en voluntarios varones normales. Los voluntarios sanos se infundieron con las dosis indicadas de AP1903 y en varios puntos temporales, se midieron los niveles séricos de AP1903 usando análisis HPLC. Los datos muestran que los niveles máximos de AP1903 se pueden titular de forma fiable en aproximadamente 2 unidades logarítmicas, alcanzándose niveles cercanos a la $C_{máx}$ en un plazo de 30 min. después de cada dosis.

Las Figs. 50A- 50B proporcionan gráficos de curvas de respuesta a la dosis que ilustran que las modificaciones en la interfaz de dímero Caspasa9 desplaza la curva de respuesta a la dosis. (50A) Para examinar tanto la señalización basal como la actividad CaspaCIDE inducida por AP1903, 10^6 células HEK293T/17 de paso temprano se transfectaron simultáneamente con 2 µg de variantes de caspasa inducibles junto con 500 ng de un plásmido de expresión mediante el uso de un promotor SRα para regular transcripcionalmente SEAP, un marcador indirecto de la viabilidad celular. Se sembraron 200 µl de la mezcla de transfección que contenía plásmidos, GeneJammer y células HEK293T/17 en IMDM + 10 % de FBS (sin antibióticos) en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Para inducir la actividad de caspasa, se añadieron 22 µl de AP1903 diluido en serie 24 horas después de la transfección. (50B) Para examinar la señalización basal e inducida por AP1903, se recogieron 100 µl de sobrenadante 48 horas después del tratamiento y se desnaturalizaron térmicamente durante 1 hora a 68 °C para inactivar las fosfatasa alcalinas endógenas. Para el ensayo, el sustrato de fosfato de 4-metilumbeliferilo (4-MUP) se hidrolizó mediante SEAP a 4-metilumbeliferona, un metabolito con un máximo de excitación a 364 nm y un máximo de emisión a 448 nm. Dado que el SEAP se usa como marcador indirecto de la viabilidad celular, una lectura SEAP más baja corresponde a un aumento de la actividad caspasa-9. Todos los mutantes de la caspasa revelaron una señalización basal disminuida y valores de CI_{50} más altos para AP1903. La caspasa F406T mostró el valor de CI_{50} más alta, seguida de F404Y, F404W y caspasa 10 (ISAQT) y, después, N405Q.

(50C) Resumen de los valores de IC_{50} estimados para los candidatos AP1903 de CaspaCIDE-2.0. Todos los mutantes mostraron una actividad SEAP aumentada y valores de la CI_{50} hasta AP1903. Los puntos de datos representan los promedios de dos pocillos. Los valores de CE_{50} se determinaron mediante un ajuste de curva de regresión no lineal de cuatro parámetros en GraphPad Prism 6.

La Fig. 51 proporciona un gráfico de CI_{50} para las dosificaciones de AP1903 correspondientes a los diversos polipéptidos de caspasa-9 modificados.

Figs. 52A y 52B: Señalización basal e inducida por AP1903 de los principales mutantes de caspasa modificados. (52A) Ensayo SEAP de células HEK 293/16 transfectadas transitoriamente con 2 µg de polipéptido de caspasa mutante y 0,5 µg de pSH1-kSEAP por millón de células HEK293 72 horas después de la transfección. iCASP-9 F404Y F404W, N405Q y F406T mostraron, todos ellos, una señalización basal inferior menor que la iCaspasa9 WT. (52B) Resumen de la actividad basal y valor estimado de la CI_{50} de los mutantes de caspasa en AP1903. Todas las mutaciones desplazan la CI_{50} hasta AP1903. Los puntos de datos reflejan el promedio de dos pocillos, y los datos mostrados son representativos de dos experimentos.

FIGS. 53A-53B: Señalización basal e inducida por AP1903 de los principales mutantes de caspasa modificados. (53A) Ensayo SEAP de células HEK 293/16 transfectadas transitoriamente con 1 o 2 µg de polipéptido de caspasa mutante y 0,5 µg de pSH1-kSEAP por millón de células HEK293 72 horas después de la transfección. iCASP-9 D330A N405Q, y el doble mutante D330A-N405Q mostraron, todos ellos, una señalización basal inferior en comparación con la caspasa-9 natural (línea discontinua). (53B) Resumen de valor estimado de la CI_{50} de los polipéptidos de caspasa mutantes en AP1903. N405Q aumenta negativamente la CI_{50} hasta AP1903. La combinación de D330A con N405Q no pudo mejorar la CI_{50} . Los puntos de datos fueron promedios de triplicados, y los datos mostrados son representativos de siete experimentos.

La Fig. 54 proporciona un gráfico del ensayo SEAP que muestra la disminución en la actividad basal observada con los mutantes T317A y T317S. Las mutaciones T317A y T317S probablemente reducen la unión a XIAP, lo que se esperaría que aumentara la señalización basal, lo contrario de lo que se observó.

5 La Fig. 55 proporciona un diagrama de barras de un ensayo SEAP de los mutantes T317A y T317S. Aunque T317A y T317S tienen menor actividad basal, son prácticamente tan sensibles a AP1903 como la caspasa-9 natural, lo que los convierte en buenos candidatos para nuevos mutantes.

10 Fig. 56: Activación basal e inducida por AP1903 de las variantes D330A. El ensayo SEAP de células HEK 293/16 transfectadas transitoriamente 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. Los datos normalizados basados en 2 ug de cada plásmido de expresión (que incluyen WT) se mezclaron con datos normalizados de transfecciones basadas en 1 ug. iCasp9-D330A, iCasp9-D330E e iCasp9-D330S mostraron una señalización basal estadísticamente inferior que la caspasa-9 natural.

15 Fig. 57: Transferencia Western de células HEK293T/16 transfectadas transitoriamente con 2 µg de pSH1-iCasp9 WT, D330A, D330E, D330N, D330V, D330G y D330S, 72 horas después de la transfección. Las transferencias se etiquetaron con una dilución 1:1000 de anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra el péptido "2A" que reconoce la secuencia 2A, derivado de diversos picornavirus. iCasp9-D330A, iCasp9-D330E e iCasp9-D330S se expresaron en niveles similares o superiores que la iCasp-9 natural. Se observó una escisión alterada en respuesta a AP1903. * representa escaleras de proteína de SuperSignal MW (Thermo Fisher Scientific) y # representa patrones de doble color Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad).

25 Fig. 58: Efectos de varias mutaciones caspasa sobre los títulos víricos derivados de células de empaquetado PG13 transducidas con sobrenadantes retrovíricos basados en envolturas VSV-G. Para examinar el efecto de la señalización basal derivada de CaspaCIDE sobre la producción de la línea celular maestra de retrovirus, la línea de células de empaquetado retrovírica, PG13, se transdujo de forma cruzada cinco veces con sobrenadantes retrovíricos basados en VSV-G en presencia de 4 µg/ml de potenciador de la transfección, polibreno. Posteriormente, se tiñeron las células PG13 transducidas con CaspaCIDE mediante anticuerpos dirigidos contra CD19 humana conjuntados con PE, como indicación de transducción. Las células PG13 transducidas con CaspaCIDE-D330A, CaspaCIDE-D330E, y CaspaCIDE-N405Q mostraron una intensidad de fluorescencia promedio (IFM) de CD19, lo que indica un elevado número de copias retrovíricas, lo que indica menor actividad basal. Para examinar más directamente el título vírico de los transductantes PG13, las células HT1080 se trataron con el sobrenadante vírico y 8 ug/ml de polibreno. Las IFM potenciadas de CD19 de los transductantes CaspaCIDE-D330A, CaspaCIDE-D330E, y CaspaCIDE-N405Q vs iCasp9 WT en células PG13 está correlacionadas positivamente con títulos víricos más altos, como se observa en células HT1080. Debido a los títulos víricos inicialmente bajos (aproximadamente 1E5 unidades de transducción (UT)/ml), no se observaron diferencias en los títulos víricos en ausencia de tratamiento de HAT para aumentar los rendimientos de los virus. Después del tratamiento con medio HAT, las células PG13 transducidas con CaspaCIDE-D330A, CaspaCIDE-D330E, y CaspaCIDE-N405Q demostraron títulos víricos más altos. El título vírico (unidades de transducción) se calcula con la fórmula: Título vírico=(n.º de células en el día de transducción) * (% CD19)/Volumen de sobrenadante (ml). Para investigar adicionalmente el efecto de los mutantes CaspaCIDE con menor actividad basal, los clones individuales (colonias) de células PG13 transducidas con CaspaCIDE se seleccionaron y se expandieron. Se observaron clones CaspaCIDE-N405Q con IFM de CD19 mayores que en otras cohortes.

45 Fig. 59: Eliminación dependiente de la dosis de AP1903 de linfocitos T transducidos con mutantes de iCasp9. Los linfocitos T primarios de donantes sanos (n=6) se transdujeron con retrovirus que codifican iCasp9 mutante o natural y el marcador de superficie celular ΔCD19. Después de la transducción, los linfocitos T transducidos con iCasp9 se purificaron mediante microperlas de CD19 y una columna magnética. A continuación, linfocitos T se expusieron a AP1903 (0-10 nm) y se midieron para determinar los linfocitos T CD3+CD19+ mediante citometría de flujo después de 24 horas.

50 Fig. 60: El mutante iCasp9-D330A demuestra una citotoxicidad mejorada dependiente de AP1903 en los linfocitos T transducidos. Los linfocitos T primarios de donantes sanos (n=6) se transdujeron con retrovirus que codifican la iCasp9 mutante o natural, o iCasp9-D330A, y el marcador de superficie celular ΔCD19. Después de la transducción, los linfocitos T transducidos con iCasp9 se purificaron mediante microperlas de CD19 y una columna magnética. A continuación, linfocitos T se expusieron a AP1903 (0-100 nm) y se midieron para determinar los linfocitos T CD3+CD19+ mediante citometría de flujo después de 24 horas.

60 Fig. 61: El mutante iCasp9-D330A demuestra una citotoxicidad mejorada dependiente de AP1903 en los linfocitos T transducidos. Los linfocitos T primarios de donantes sanos (n=6) se transdujeron con retrovirus que codifican la iCasp9 mutante o natural, o iCasp9-D330A, y el marcador de superficie celular ΔCD19. Después de la transducción, los linfocitos T transducidos con iCasp9 se purificaron mediante microperlas de CD19 y una columna magnética. A continuación, linfocitos T se expusieron a AP1903 (0-100 nm) y se midieron para determinar los linfocitos T CD3+CD19+ mediante citometría de flujo después de 24 horas. La CI₅₀ de iCasp9-D330A fue significativamente inferior (p=0,002) que la iCasp9 natural.

65

Fig. 62: Los miembros de la familia de D330 demuestran una citotoxicidad dependiente de AP1903 similar a D330A en linfocitos T transducidos. Los linfocitos T primarios de donantes sanos (n=2) se transdujeron con retrovirus que codifican los D330 mutantes o la iCasp9 natural y el marcador de superficie celular Δ CD19. Después de la transducción, los linfocitos T transducidos con iCasp9 se purificaron mediante microperlas de CD19 y una columna magnética. A continuación, linfocitos T se expusieron a AP1903 (0-100 nm) y se midieron para determinar los linfocitos T $CD3^+CD19^+$ mediante citometría de flujo después de 24 horas.

Fig. 63: Los mutantes iCasp9 con una sensibilidad menor a AP1903 siguen controlando la proliferación de linfocitos T in vitro. Los linfocitos T activados fueron transducidos con mutantes de iCasp9 y se trataron con AP1903 (flecha) en los días 0 y 4 y, posteriormente, se enumeraron durante 10 días. Tanto la variante natural, D330A y otros mutantes de iCasp9 detuvieron la proliferación de linfocitos T y disminuyeron la supervivencia de linfocitos T después de 10 días.

Fig. 64: La expresión transgénica mejorada de los N405Q mutantes mejora la citotoxicidad dependiente de AP-1903 en linfocitos T transducidos. Los linfocitos T se transdujeron con un retrovirus RD114 pseudotipificado que codifica la iCasp9 natural, N405Q, N405Q con optimización de codones, y Fv.Fv'.N405Q y después se trataron con una dosis variable de AP1903 (0-100 nM). Después de 24 horas, se midieron los linfocitos T $CD3^+CD19^+$ mediante citometría de flujo. El porcentaje remanente se normalizó a la frecuencia de linfocitos T $CD3^+CD19^+$ sin AP1903.

Fig. 65: Eliminación in vivo dependiente de la dosis de AP1903 de linfocitos T transducidos con iCasp9 natural. Los linfocitos T se transdujeron con retrovirus FG-iCasp9-2A- Δ CD19 y se inyectaron i.v. en ratones con inmunodeficiencia (NSG). Después de 24 horas, los ratones se inyectaron i.p. con AP1903 (0-5 mg/kg). Al cabo de otras 24 horas, los ratones se sacrificaron y los linfocitos del bazo (A) y de sangre periférica (B) se aislaron y analizaron mediante citometría de flujo para determinar la frecuencia de los linfocitos T $CD3^+CD19^+$.

Fig. 66: Eliminación in vivo dependiente de la dosis de AP1903 de linfocitos T transducidos con iCasp9 D330E. Los linfocitos T se transdujeron con retrovirus SFG-iCasp9-D330E-2A- Δ CD19 y se inyectaron i.v. en ratones con inmunodeficiencia (NSG). Después de 24 horas, los ratones se inyectaron i.p. con AP1903 (0-5 mg/kg). Al cabo de otras 24 horas, los ratones se sacrificaron y los linfocitos del bazo (A) se aislaron y analizaron mediante citometría de flujo para determinar la frecuencia de los linfocitos T $CD3^+CD19^+$. Esto muestra que iCasp9-D330E demuestra un perfil de citotoxicidad in vivo en su respuesta a AP1903 similar a la de iCasp9 natural.

Descripción detallada

Como se utiliza en la presente memoria, el uso de la palabra “un” o “uno” cuando se usa junto con el término “que comprende” en las reivindicaciones y/o en la memoria descriptiva puede significar también “una”, pero es también consistente con el significado de “uno/una o más”, “al menos uno/una”, y “uno/una o más de uno/una”. Adicionalmente, los términos “que tiene”, “que incluye”, “que contiene” y “que comprende” son indistintos y un experto en la técnica reconoce que estos términos son términos abiertos.

El término “alógeno”, como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a loci HLA o MHC que se antigénicamente distintos.

Por lo tanto, las células o tejidos transferidos entre las mismas especies pueden ser antigénicamente distintos. Los ratones singénicos pueden diferir en uno o más loci (congénicos) y los ratones alógenos pueden tener el mismo fondo.

El término “antígeno”, como se utiliza en la presente memoria, se define como una molécula que provoca una respuesta inmunitaria. Esta respuesta inmunitaria puede implicar tanto la producción de anticuerpos como la activación de células inmunocompetentes específicas, o ambas.

El término “cáncer”, como se utiliza en la presente memoria, se define como una hiperproliferación de células cuyo único rasgo -la pérdida de los controles normales- da como resultado un crecimiento desregulado, falta de diferenciación, invasión del tejido local, y metástasis. Los ejemplos incluyen, aunque no de forma limitativa, melanoma, de pulmón no microcítico, de pulmón microcítico, de pulmón, hepatocarcinoma, leucemia, retinoblastoma, astrocitoma, glioblastoma, de lengua, neuroblastoma, de cabeza, de cuello, mama, pancreático, próstata, renal, óseo, testicular, de ovario, mesotelioma, de cuello de útero, gastrointestinal, linfoma, de cerebro, de colon, sarcoma o de vejiga.

Donantes: El término “donante” se refiere a un mamífero, por ejemplo, un ser humano, que no es el paciente receptor. El donante puede, por ejemplo, tener una HLA idéntica a la del receptor, o puede tener una disparidad parcial o superior con el receptor, en términos de HLA.

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

Enfermedad hematológica: Las expresiones “enfermedad hematológica”, “enfermedad sanguínea” y/o “enfermedades de la sangre”, como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a dolencias que afectan a la producción de sangre y de sus componentes, que incluyen aunque no de forma limitativa, células sanguíneas, hemoglobina, proteínas de la sangre, el mecanismo de coagulación, producción de sangre, producción de proteínas de la sangre, sustancias similares y combinaciones de los mismos. Los ejemplos no limitativos de enfermedades hematológicas incluyen anemias, leucemias, linfomas, neoplasias hematológicas, albuminemias, hemofilias y similares.

Enfermedad de la médula ósea: La expresión “enfermedad de la médula ósea”, como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a dolencias que producen una disminución en la producción de células sanguíneas y plaquetas de la sangre. En algunas enfermedades de la médula ósea, la arquitectura normal de la médula ósea se puede alterar debido a infecciones (por ejemplo, tuberculosis) o neoplasias, que a su vez pueden producir disminución en la producción de células sanguíneas y plaquetas de sangre. Los ejemplos no limitativos de enfermedades de médula ósea incluyen leucemias, infecciones bacterianas (p. ej., tuberculosis), enfermedad o envenenamiento por radiación, apnecitopenia, anemia, mieloma múltiple y similares.

Linfocitos T y linfocitos T activados (se incluye que esto significa linfocitos CD3⁺): Los linfocitos T (también denominados células T) pertenecen a un grupo de glóbulos blancos de la sangre denominados linfocitos. Los linfocitos están implicados, generalmente, en la inmunidad mediada por células. La “T” en los “linfocitos T” se refiere a células derivadas o cuya maduración está afectada por el timo. Los linfocitos T pueden distinguirse de otros tipos de linfocitos, tales como los linfocitos B y los linfocitos citolíticos naturales (NK) por la presencia de proteínas de la superficie celular denominadas como receptores de linfocitos T. La expresión “linfocitos T activados”, como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a linfocitos T que se han estimulado para producir una respuesta inmunitaria (p. ej., expansión clonal de linfocitos T activados) mediante el reconocimiento de un determinante antigénico presentado en el contexto de un marcador de histocompatibilidad (MHC) mayor de Clase II. Los linfocitos T se activan mediante la presencia de un determinante antigénico, citoquinas y/o linfocinas y agrupaciones de diferenciación de proteínas de la superficie celular (p. ej., CD3, CD4, CD8, otras similares y combinaciones de las mismas). Las células que expresan una agrupación de proteínas diferenciada frecuentemente se consideran como “positivas” para la expresión de dicha proteína sobre la superficie de los linfocitos T (p. ej., los linfocitos positivos para la expresión de CD3 o CD4 reciben el nombre de CD3⁺ o CD4⁺). Las proteínas CD3 y CD4 son receptores o correceptores de la superficie celular que pueden participar directa o indirectamente en la transducción de la señal en linfocitos T.

Sangre periférica: El término “sangre periférica”, como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a los componentes celulares de sangre (p. ej., glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas) que se obtienen o se preparan a partir del combinado sanguíneo en circulación y no secuestrados dentro del sistema linfático, bazo, hígado o médula ósea.

Sangre del cordón umbilical: La sangre de cordón umbilical es distinta de la sangre periférica y de la sangre secuestrada dentro del sistema linfático, bazo, hígado o médula ósea. Las expresiones “sangre del cordón umbilical”, “sangre umbilical” o “sangre del cordón”, que se pueden utilizar de manera indistinta, hacen referencia a la sangre que permanece en la placenta y en el cordón umbilical unido después del nacimiento del bebé. La sangre del cordón contiene frecuentemente citoblastos, incluidos los hemocitoblastos.

Por “obtenido o preparado” tal como, por ejemplo, en el caso de células, se entiende que las células o el cultivo celular se aíslan, purifican o purifican parcialmente de la fuente, donde la fuente puede ser, por ejemplo, sangre del cordón umbilical, médula ósea o sangre periférica. Los términos pueden aplicarse también cuando la fuente original, o un cultivo celular, se ha cultivado y las células se han replicado y donde las células de la progenie se derivan ahora de la fuente original.

Por “destruir” o “destrucción” tal como en porcentaje de células destruidas, se entiende la muerte de una célula por apoptosis, medida con cualquier método conocido para medir la apoptosis y, por ejemplo, mediante el uso de los ensayos analizados en la presente memoria tales como, por ejemplo, los ensayos SEAP o ensayos de linfocitos T analizados en la presente memoria. El término también puede referirse a la ablación celular.

Alorreducción: El término “alorreducción” como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a la reducción selectiva de linfocitos T alorreactivos. La expresión “linfocitos T alorreactivos”, como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a linfocitos T activados para producir una respuesta inmunitaria como reacción a la exposición a células extrañas, tales como, por ejemplo, en un aloinjerto trasplantado. La reducción selectiva implica, generalmente, dirigir varios marcadores o proteínas expresados en la superficie celular (p. ej., a veces un grupo de proteínas de diferenciación (proteínas CD), CD19 o similares, para su eliminación mediante inmunomanes, inmunotoxinas, clasificación de flujo, inducción de apoptosis, técnicas de fotorreducción, otras similares o combinaciones de las mismas. En los presentes métodos, las células se pueden transducir o transfectar con el vector que codifica la proteína quimérica antes o después de la alorreducción. Además, las células se pueden transducir o transfectar con el vector que codifica la proteína quimérica sin una etapa de alorreducción, y las células no alorreducidas se pueden administrar al paciente. Debido al 'interruptor de seguridad' añadido es posible, por ejemplo, administrar los linfocitos T no alorreducidos ya que un evento adverso, tal como por ejemplo, la enfermedad del injerto contra el hospedador, se puede aliviar mediante la administración del ligando multimérico.

5 Enfermedad del injerto contra el hospedador: Los términos “enfermedad del injerto contra el hospedador” o “GvHD” hacen referencia a una complicación frecuentemente asociada con el trasplante de médula ósea alogénico y algunas veces asociada con transfusiones de sangre no irradiada a pacientes inmunocomprometidos. La enfermedad del injerto
 10 contra el hospedador se puede producir a veces cuando células inmunitarias funcionales de la médula trasplantada reconocen al receptor como “extraño” y desencadenan una respuesta inmunitaria. La GvHD puede dividirse en forma aguda y forma crónica. Frecuentemente, la GVHD aguda (aGVHD) se observa en los primeros 100 días después del trasplante o transfusión y puede afectar el hígado, la piel, la mucosa, el sistema inmunitario (p. ej., el sistema hematopoyético, médula ósea, timo y similares), los pulmones y el tracto gastrointestinal. La GVHD crónica (cGVHD) se
 15 inicia frecuentemente 100 días o después del trasplante o transfusión, y puede atacar los mismos órganos que la GvHD aguda, pero también puede afectar al tejido conjuntivo y a las glándulas exocrinas. La GvHD aguda cutánea puede dar como resultado una erupción cutánea maculopapular difusa, a veces con un patrón de tipo encaje. La enfermedad del injerto contra el hospedador se puede diagnosticar en un estadio concreto. Aliviar la enfermedad puede incluir, por ejemplo, reducir el estadio de la enfermedad. Por ejemplo, después del tratamiento, un paciente que presenta síntomas de la Etapa 4 puede presentar síntomas de la Etapa 3, 2 o 1, o ningún síntoma de GvHD.

20 Donantes de linfocitos T: El término “donante de linfocitos T”, como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a linfocitos T que frecuentemente se administran a un receptor para transmitir una inmunidad antivírica y/o antitumoral después del trasplante de citoblastos alogénicas. A menudo se utilizan linfocitos T de donantes para inhibir el rechazo al trasplante de médula y aumentar el éxito del aloinjerto, sin embargo los propios linfocitos T del donante pueden producir una respuesta aloagresiva contra los antígenos del hospedador, lo que a su vez puede dar como resultado la enfermedad del injerto contra el hospedador (GVHD). Ciertos linfocitos T activados del donante pueden producir una respuesta GvHD más alta o más baja que otros linfocitos T activados. Los linfocitos T del donante pueden ser también reactivos contra células tumorales del receptor, produciendo un efecto ventajoso del injerto contra el tumor.

25 Células del estroma mesenquimal: Los términos “célula del estroma mesenquimal” o “célula del estroma mesenquimal derivada de la médula ósea”, como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a citoblastos multipotentes que pueden diferenciarse ex vivo, in vitro e in vivo en adipocitos, osteoblastos y condroblastos, y se pueden definir además como una fracción de células mononucleares de la médula ósea que se adhieren a placas de cultivo de plástico en condiciones de cultivo estándar, son negativas para los marcadores de linaje de células hematopoyéticas y son positivas para CD73, CD90 y CD105.

30 Embriocitoblastos: El término “embriocitoblastos” como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a los citoblastos pluripotentes que pueden derivarse de la masa celular interna del blastocisto, un embrión en etapa inicial que contiene de 50 a 150 células. Los embriocitoblastos se caracterizan por su capacidad de renovarse indefinidamente y por su capacidad para diferenciarse en derivados de las tres capas germinales principales, ectodermo, endodermo y mesodermo. Las células pluripotentes se distingue de las multipotentes en que las células pluripotentes células pueden generar todos los tipos de células, mientras que las células multipotentes (p. ej., citoblastos adultos) solo pueden producir un número limitado de tipos de células.

35 Citoblastos pluripotentes inducibles: Los términos “citoblastos inducibles” o “citoblastos pluripotentes inducibles”, como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a células adultas o diferenciadas que se han “reprogramado” o inducido mediante manipulación genética (p. ej., expresión de genes que a su vez activan la pluripotencia), biológica (p. ej., virus o retrovirus de tratamiento) y/o química (p. ej., moléculas pequeñas, péptidos y similares) que pueden diferenciarse en muchos, incluso todos los tipos de células, como los embriocitoblastos. Los citoblastos pluripotentes inducibles se distinguen de los embriocitoblastos en que alcanzan un estado intermedio o parcialmente diferenciado (p. ej., células cutáneas, células óseas, fibroblastos y similares) y después, se inducen para desdiferenciarse, recuperando de este modo parte o toda la capacidad de generar células multipotentes o pluripotentes.

40 Célula CD34⁺: El término “célula CD34⁺” como se utiliza en la presente memoria hace referencia a una célula que expresa la proteína CD34 sobre su superficie celular. “CD34”, como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a una glicoproteína de la superficie celular (p. ej., proteína sialomucina) que frecuentemente actúa como un factor de adhesión entre células y está implicada en la entrada de linfocitos T en ganglios linfáticos, y es un miembro de la familia de genes del “grupo de diferenciación”. CD34 también pueden mediar la unión de los citoblastos a la médula ósea, matriz extracelular o directamente a las células del estroma. Las células CD34⁺ frecuentemente se encuentran en el
 55 cordón umbilical y en la médula ósea como células hematopoyéticas, un subconjunto de citoblastos mesenquimales, células precursoras endoteliales, células endoteliales de los vasos sanguíneos pero no linfáticos (salvo los vasos linfáticos pleurales), mastocitos, una subpoblación de células dendríticas (que son negativas para el factor XIIIa) en el intersticio y alrededor de la adnexa de la dermis cutánea, así como en células de ciertos tumores de tejido blando (p. ej., sarcoma alveolar de partes blandas, leucemia linfoblástica de linfocitos B preaguda (Pre-B_{LLA}), leucemia mielógena aguda (LMA), LMA-M7, dermatofibrosarcoma protuberans, tumores del estroma gastrointestinal, fibroblastoma de células gigantes, sarcoma granulocítico, sarcoma de Kaposi, liposarcoma o, histiocitoma fibroso maligno, tumores malignos de la vaina de los nervios periféricos, hemangiopericitomas meníngeos, meningiomas, neurofibromas, schwannomas y carcinoma papilar de tiroides).

Los linfocitos infiltrados tumorales (TIL) se refieren a linfocitos T que tienen varios receptores que infiltran los tumores y destruyen las células tumorales de una forma dirigida. La regulación de la actividad de los TIL usando los métodos de la presente descripción permitiría un control más directo de la eliminación de células tumorales.

5 Vector de expresión génica: Las expresiones “vector de expresión génica”, “vector de expresión de ácido nucleico” o “vector de expresión”, como se utiliza en la presente memoria, que se pueden utilizar indistintamente en el documento, se refieren de manera general a una molécula de ácido nucleico (p. ej., un plásmido, fago, secuencia de replicación autónoma (ARS), cromosoma artificial, cromosoma artificial de levadura (p. ej., YAC)) que se pueden replicar en una célula hospedadora y usarse para introducir un gen o genes en una célula hospedadora. Los genes introducidos en el vector de expresión pueden ser genes endógenos (p. ej., un gen que se encuentra normalmente en la célula u organismo hospedador) o genes heterólogos (p. ej., genes que no se encuentran normalmente en el genoma o ácidos nucleicos extracromosómicos de la célula u organismo hospedador). Los genes introducidos en una célula por medio de un vector de expresión pueden ser genes naturales o genes que se han modificado o diseñado mediante ingeniería genética. El vector de expresión génica también se puede diseñar mediante ingeniería genética para contener secuencias reguladoras no traducidas en 5' y 3' que, algunas veces, 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. Algunas veces, un vector de expresión génica también se diseña por ingeniería para la replicación y/o funcionalidad de expresión (por ejemplo, transcripción y traducción) en un tipo de célula, ubicación celular o tipo de tejido particular. Algunas veces, los vectores de expresión incluyen un marcador seleccionable para mantener el vector en la célula hospedadora o receptora.

Promotor regulado por el desarrollo: La expresión “promotor regulado por el desarrollo”, como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a un promotor que actúa como el sitio de unión inicial para que la ARN polimerasa transcriba un gen que se expresa en ciertas condiciones controladas, iniciadas o alteradas por un programa o ruta de desarrollo. Los promotores regulados por el desarrollo tienen frecuentemente regiones de control adicionales en o cerca de la región promotora para que se unan activadores o represores de la transcripción que pueden tener influencia sobre la transcripción de un gen que forma parte de un programa o ruta de desarrollo. Algunas veces, los promotores regulados por el desarrollo están implicados en la transcripción de genes cuyos productos génicos tienen influencia sobre la diferenciación de las células durante su desarrollo.

Células diferenciadas por el desarrollo: La expresión “células diferenciadas por el desarrollo”, como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a células que han experimentado un proceso que frecuentemente implica la expresión de genes regulados por el desarrollo específicos, por el cual la célula evoluciona de una forma menos especializada a una forma más especializada para realizar una función específica. Los ejemplos no limitativos de células diferenciadas por el desarrollo son células hepáticas, células pulmonares, células cutáneas, células nerviosas, células sanguíneas, y similares. Los cambios en la diferenciación por desarrollo generalmente implican cambios en la expresión génica (p. ej., cambios en patrones de expresión génica), reorganización genética (p. ej., remodelación de cromatina para ocultar o expresar genes que se silenciarán o expresarán, respectivamente) y, ocasionalmente, implican cambios en las secuencias de ADN (p. ej., la diferenciación de la diversidad inmunitaria). La diferenciación celular durante el desarrollo puede entenderse como el resultado de una red reguladora de genes. Un gen regulador y sus módulos reguladores en cis son nodos de una red reguladora de genes que recibe entradas (p. ej., proteína expresada anteriormente en una ruta o programa de desarrollo) y crea salidas en otra parte de la red (p. ej., el producto génico expresado actúa sobre otros genes posteriores de la ruta o programa de desarrollo).

Los términos “célula” “línea celular” y “cultivo celular”, como se utilizan en la presente memoria, se pueden utilizar indistintamente. Todos estos términos incluyen también su progenie, que son cualquiera y todas las generaciones posteriores. Se entiende que puede que puede que no toda la progenie sea idéntica debido a mutaciones deliberadas o accidentales.

Como se utiliza en la presente memoria, las expresiones “molécula de icaspasa-9”, polipéptido o proteína, definen 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 tanto la secuencia natural de nucleótidos o aminoácidos de icaspasa-9 como una secuencia truncada que carece del dominio CARD. Sin indicar que el polipéptido está “modificado” mediante el uso del término, u otros medios, se considera que un “polipéptido de caspasa-9” es el “natural”. Por polipéptido de caspasa-9 “natural”, en el contexto de los detalles experimentales proporcionados en la presente memoria, se entiende el polipéptido de caspasa-9 que carece del dominio CARD.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “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 los ácidos nucleicos de la iCaspasa 1, 3 u 8, los polipéptidos de iCaspasa 1, 3 u 8 y/o los vectores de expresión de iCaspasa 1, 3 u 8, respectivamente. El término también abarca tanto la secuencia natural de nucleótidos o aminoácidos de la caspasa natural icaspasa-1, 3 u 8, respectivamente, como una secuencia truncada que carece del dominio CARD.

Los polipéptidos de caspasa-9 modificados comprenden al menos una sustitución de aminoácidos que afecta la actividad basal o la Cl_{50} , en un polipéptido quimérico que comprende el polipéptido de caspasa-9 modificado. Los métodos para

analizar la actividad y CI50 se describen en la presente memoria. Los polipéptidos de caspasa-9 que no están modificados no comprenden este tipo de sustitución de aminoácidos. Tanto los polipéptidos de caspasa-9 modificados como los polipéptidos de caspasa-9 que no están modificados pueden estar truncados, por ejemplo, para eliminar el dominio CARD.

5 “Variantes conservativas de función” son proteínas o enzimas en las que un resto de aminoácido dado se ha modificado sin alterar la conformación y función global de la proteína o enzima, incluida, aunque no de forma limitativa, la sustitución de un aminoácido por otro que tenga propiedades similares, incluido el carácter polar o no polar, el tamaño, la forma y la carga. Las sustituciones de aminoácidos conservativas para muchos de los aminoácidos no codificados genéticamente habitualmente conocidos son bien conocidos en la materia. Las sustituciones conservativas para otros aminoácidos no codificados pueden determinarse según sus propiedades físicas en comparación con las propiedades de los aminoácidos genéticamente codificados.

15 Los aminoácidos que no sean los indicados como conservados pueden diferir en una proteína o enzima de modo que el porcentaje de similitud en la secuencia de la proteína o el aminoácido entre dos proteínas de función similar puede variar y puede ser, por ejemplo, al menos un 70 %, preferiblemente al menos un 80 %, más preferiblemente al menos un 90 %, y con máxima preferencia al menos un 95 %, tal como se determina según un esquema de alineación. Como se utiliza en la presente memoria, “similitud de secuencia” significa el grado en el que las secuencias de nucleótidos o proteínas están relacionadas. El grado de similitud entre dos secuencias se puede basar en el porcentaje de identidad y/o conservación de la secuencia. En la presente memoria, “identidad de secuencia” significa el grado en que dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos son invariantes. “Alineación de secuencias” significa el proceso de alinear dos o más secuencias para lograr niveles máximos de identidad (y, en el caso de las secuencias de aminoácidos, conservación) con el fin de evaluar el grado de similitud. En la técnica se conocen numerosos métodos para alinear secuencias y evaluar la similitud/identidad, tal como, por ejemplo, el Método de agrupamiento, en donde la similitud se basa en el algoritmo MEGALIGN, así como BLASTN, BLASTP y FASTA. Cuando se usa cualquiera de estos programas, las configuraciones preferidas son las que dan como resultado la mayor similitud de secuencias.

25 Los números de resto de aminoácido mencionados en la presente memoria reflejan la posición del aminoácido en el polipéptido de caspasa-9 no truncado y no modificado, por ejemplo, el de la Id. de sec. n.º: 9. La Id. de sec. n.º: 9 proporciona una secuencia de aminoácidos para el polipéptido de caspasa-9 truncado, que no incluye el dominio CARD. Por lo tanto, la Id. de sec. n.º: 9 comienza en el resto de aminoácido número 135 y finaliza en el resto de aminoácido número 416, en referencia a la secuencia de ácidos nucleicos de la caspasa-9 de longitud completa. Los expertos en la técnica pueden alinear la secuencia con otras secuencias de polipéptidos de caspasa-9 para, si se desea, correlacionar el número de resto de aminoácido, por ejemplo, usando los métodos de alineamiento de secuencias descritos en la presente memoria.

35 Como se utiliza en la presente memoria, se pretende que el término “ADNc” se refiera al ADNc preparado utilizando ARN mensajero (ARNm) como molde. La ventaja de usar un ADNc, en oposición al ADN genómico o 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 veces en las que se utiliza la secuencia genómica completa o parcial, tal como cuando se necesitan las regiones no codificantes para la expresión óptima o cuando se van a dirigir regiones no codificantes tales como intrones en una estrategia de sentido contrario.

45 Como se utiliza en la presente memoria, el término “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 todo o parte del ácido nucleico que codifica la secuencia que se puede transcribir se puede insertar en el vector. El transcrito se traduce a una proteína, pero esto no es obligatorio. La expresión puede incluir tanto la transcripción de un gen como la traducción del ARNm a un producto génico. Además, la expresión puede incluir solo la transcripción del ácido nucleico que codifica genes de interés. La expresión “construcción terapéutica” puede utilizarse también para referirse a la construcción de expresión o al transgén. La construcción de expresión o el transgén se pueden utilizar, por ejemplo, como terapia para tratar enfermedades o trastornos hiperproliferativos, tales como cáncer; por lo tanto, la construcción de expresión o el transgén es una construcción terapéutica o una construcción profiláctica.

55 Como se utiliza en la presente memoria, el término “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 se puede transcribir. En algunos casos, las moléculas de RNA se traducen a continuación a una proteína, polipéptido o péptido. En otros casos, estas secuencias no se traducen, por ejemplo, en la producción de moléculas de sentido contrario o ribozimas. Los vectores de expresión pueden contener una variedad de secuencias de control, que se refieren a las secuencias de ácido nucleico necesarias para la transcripción y, posiblemente, la traducción de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo hospedador concreto. Además de las secuencias de control que controlan la transcripción y la traducción, los vectores y vectores de expresión pueden contener secuencias de ácido nucleico que sirven también a otras funciones, como y se describe más adelante.

60 Como se utiliza en la presente memoria, el término “ex vivo” se refiere a “fuera” del cuerpo. Los términos “ex vivo” e “in vitro” se pueden utilizar indistintamente en la presente memoria.

65

- 5 Como se utiliza en la presente memoria, el término soporta “funcionalmente equivalente”, en los relativo a la caspasa-9 o la caspasa-9 truncada, por ejemplo, se refiere a un fragmento, variante o análogo del ácido nucleico de la caspasa-9 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 que puede inducir una respuesta celular apoptótica. Cuando el término “funcionalmente equivalente” se aplica a otros ácidos nucleicos o polipéptidos, tales como, por ejemplo, CD19, la LTR en 5', la región de unión a ligando multimérico o a CD3, se refiere a fragmentos, variantes y similares que tienen una actividad igual o similar a la de los polipéptidos de referencia de los métodos de la presente memoria.
- 10 Como se utiliza en la presente memoria, el término “gen” se define como una proteína, polipéptido o unidad que codifica el péptido funcional. Como se comprenderá, este término funcional incluye secuencias genómicas, secuencias de ADNc y segmentos génicos de tamaño más pequeño diseñados mediante ingeniería genética que expresan, o están adaptados para expresar, proteínas, polipéptidos, dominios, péptidos, proteínas de fusión y mutantes.
- 15 La expresión “enfermedad hiperproliferativa” se define como una enfermedad que es el resultado de una hiperproliferación de células. Las enfermedades hiperproliferativas ilustrativas incluyen, aunque no de forma limitativa, cáncer o enfermedades autoinmunitarias. Otras enfermedades hiperproliferativas pueden incluir oclusión vascular, restenosis, aterosclerosis o enfermedad inflamatoria del intestino.
- 20 La expresión “composición inmunógena” o “inmunógeno” se refiere a una sustancia que puede provocar una respuesta inmunitaria. Los ejemplos de inmunomoduladores incluyen, por ejemplo, antígenos, autoantígenos que desempeñan una función en la inducción de enfermedades autoinmunitarias, y antígenos asociados con tumores expresados en células cancerosas.
- 25 El término “inmunocomprometido”, como se utiliza en la presente memoria, se define como un sujeto que tiene un sistema inmunitario reducido o debilitado. El estado inmunocomprometido 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 clasificación permite una base conceptual para la evaluación, los individuos inmunocomprometidos frecuentemente no encajan completamente en un grupo u otro. Puede verse afectado más de un defecto en los mecanismos de defensa del cuerpo. Por ejemplo, los individuos con un defecto de linfocitos T específicos producido por el VIH pueden tener también neutropenia producida por los fármacos utilizados para el tratamiento antivírico o estar inmunocomprometidos debido a una rotura en la integridad de la piel y las membranas mucosas. Un estado inmunocomprometido puede ser el resultado de líneas centrales permanentes u otros tipos de deterioro debido a drogodependencia intravenosa; o estar producido por neoplasias malignas secundarias, malnutrición o haber sido infectados por otros agentes infecciosos tales como tuberculosis o enfermedades de transmisión sexual, p. ej., sífilis o hepatitis.
- 35 Como se utiliza en la presente memoria, la expresión “farmacéuticamente o farmacológicamente aceptable” se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen reacciones adversas, alérgicas u otras reacciones perjudiciales cuando se administran a un animal o ser humano.
- 40 Como se utiliza en la presente memoria, “portador farmacéuticamente aceptable” incluye cualesquiera disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos retardantes de la absorción, y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es muy conocido en la técnica. Salvo en la medida que algún medio o agente convencional sea incompatible con los vectores o células presentadas en la presente memoria, se contempla su uso en composiciones terapéuticas. En las composiciones también se pueden incorporar ingredientes activos complementarios.
- 45 Como se utiliza en la presente memoria, el término “polinucleótido” se define como una cadena de nucleótidos. Además, los ácidos nucleicos son polímeros de nucleótidos. Por lo tanto, ácidos nucleicos y polinucleótidos, como se utiliza en la presente memoria, son indistintos. Los ácidos nucleicos son polinucleótidos, que se pueden hidrolizar a “nucleótidos” monoméricos. Los nucleótidos monoméricos se pueden hidrolizar a nucleósidos. Como se utiliza en la presente memoria, los polinucleótidos incluyen, aunque no de forma limitativa, todas las secuencias de ácidos nucleicos que se obtienen por cualquier medio disponible en la técnica, incluidos aunque no de forma limitativa, medios recombinantes, es decir, la clonación de secuencias de ácidos nucleicos de una genoteca recombinante o un genoma celular, usando tecnología de clonación ordinaria y PCRTM, y similares, y por medios sintéticos. Además, los polinucleótidos incluyen mutaciones de los polinucleótidos, que incluyen, aunque no de forma limitativa, mutación de los nucleótidos o nucleósidos por métodos bien conocidos en la técnica. Un ácido nucleico puede comprender uno o más polinucleótidos.
- 50 Como se utiliza en la presente memoria, el término “polipéptido” se define como una cadena de restos de aminoácidos, que tiene normalmente una secuencia predefinida. Como se utiliza en la presente memoria, el término polipéptido es indistinto con los términos “péptidos” y “proteínas”.
- 55 En la presente memoria, el término “promotor” se define como una secuencia de ADN reconocida por la maquinaria sintética de la célula, o la maquinaria sintética introducida, necesaria para iniciar la transcripción de un gen específico.
- 60
- 65

Los términos “transfección” y “transducción” son indistintos y se refieren al proceso por el cual se introduce una secuencia de ADN exógeno en una célula hospedadora eucariota. La transfección (o transducción) se puede lograr mediante un cualquiera de una variedad de medios que incluyen electroporación, microinyección, administración mediante pistola génica, infección retroviral, lipofección, superfección y similares.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “singénico” se refiere a células, tejidos o animales que tienen genotipos idénticos o lo suficientemente relacionados como para permitir el trasplante de tejido, o que sean inmunitariamente compatibles. Por ejemplo, gemelos idénticos o animales de la misma cepa endogámica. Singénico e isogénico se pueden usar de manera indistinta.

Los términos “paciente” o “sujeto” son indistintos y, como se utiliza en la presente memoria, aunque no de forma limitativa, incluyen un organismo o un animal; un mamífero incluido p. ej., un ser humano, un primate no humano (p. ej., mono), ratón, cerdo, vaca, cabra, conejo, rata, cobaya, hámster, caballo, mono, oveja, u otro mamífero no humano; un no mamífero, incluido p. ej. un vertebrado no mamífero, tal como un ave (p. ej., un pollo o un pato) o un pez, y un invertebrado no mamífero.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “bajo control transcripcional” o “unido operativamente” se define como el promotor que está en la ubicación y en la orientación correcta con respecto al ácido nucleico para controlar el inicio de la ARN polimerasa y la expresión de gen.

Como se utiliza en la presente memoria, los términos “tratamiento”, “trata”, “tratado” o “que trata” se refiere a la profilaxia y/o el tratamiento.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “vacuna” se refiere a una formulación que contiene una composición presentada en la presente memoria que está en una forma que se puede administrar a un animal. De forma típica, la vacuna comprende una solución salina convencional o un medio de solución acuosa tamponada en el que la composición se suspende o se disuelve. En esta forma, la composición se puede utilizar convenientemente para prevenir, mejorar o tratar de otra forma una dolencia. Tras la introducción en un sujeto, la vacuna puede producir una respuesta inmunitaria que incluye, aunque no de forma limitativa, la producción de anticuerpos, citocinas y/u otras respuestas celulares.

El ácido nucleico puede estar contenido dentro de un vector vírico. El vector vírico puede ser un vector retroviral. El vector vírico puede ser un vector adenoviral o un vector lentiviral. Se entiende que la célula presentadora de antígenos puede ponerse en contacto con el vector vírico ex vivo, y que la célula presentadora de antígenos puede ponerse en contacto con el vector vírico in vivo.

Citoblastos hematopoyéticos y terapia celular

Los hemocitoblastos incluyen células precursoras hematopoyéticas, células inmaduras, células multipotentes que pueden diferenciarse en tipos de células sanguíneas maduras. Estos citoblastos y células precursoras pueden aislarse de la médula ósea y la sangre del cordón umbilical y, en algunos casos, de la sangre periférica. Otros citoblastos y células precursoras incluyen, por ejemplo, células del estroma mesenquimal, embriocitoblastos, y citoblastos pluripotentes inducibles.

Las células del estroma mesenquimal derivadas de médula ósea (MSC) se han definido como una fracción de células mononucleares de médula ósea que se adhieren a placas de cultivo de plástico en condiciones de cultivo estandarizadas, son negativas para los marcadores de linaje de células hematopoyéticas y positivas para CD73, CD90 y CD105, y tienen la capacidad de diferenciarse in vitro en adipocitos, osteoblastos y condroblastos. Aunque se supone que una función fisiológica es el soporte de la hematopoyesis, varios informes han establecido también que las MSC tienen la capacidad de incorporar y posiblemente de proliferar en áreas de crecimiento activo, tales como tejidos en cicatrización y neoplásicos, y para albergar su microentorno natural y sustituir la función de las células enfermas. Su potencial de diferenciación y capacidad de albergue convierte las MSC en vehículos atractivo para la terapia celular, tanto en su forma natural para aplicaciones de regeneración como mediante su modificación genética para la administración de agentes biológicos activos a microentornos específicos tales como médula ósea enferma o depósitos metastásicos. Además, las MSC tienen potente actividad inmunosupresora intrínseca y, hasta la fecha, han encontrado su aplicación más frecuente en el tratamiento experimental de la enfermedad del injerto contra el hospedador y los trastornos autoinmunitarios (Pittenger, M. F. y col. (1999). *Science* 284: 143-147; Dominici, M., y col. (2006). *Cytotherapy* 8: 315-317; Prockop, D. J. (1997). *Science* 276: 71-74; Lee, R. H., y col. (2006). *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 17438-17443; Studeny, M., y col., (2002). *Cancer Res* 62: 3603-3608; Studeny, M., y col. (2004). *J Natl Cancer Inst* 96: 1593-1603; Horwitz, E. M., y col. (1999). *Nat Med* 5: 309-313; Chamberlain, G., y col., (2007). *Stem Cells* 25: 2739-2749; Phinney, D. G., y Prockop, D. J. (2007). *Stem Cells* 25: 2896-2902; Horwitz, E. M., y col. (2002). *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 8932-8937; Hall, B., y col., (2007). *Int J Hematol* 86: 8-16; Nauta, A. J., y Fibbe, W. E. (2007). *Blood* 110: 3499-3506; Le Blanc, K., y col. (2008). *Lancet* 371: 1579-1586; Tyndall, A., y Uccelli, A. (2009). *Bone Marrow Transplant*).

Las MSC se han sido infundidos a cientos de pacientes con mínimos efectos adversos notificados. Sin embargo, el seguimiento es limitado, los efectos secundarios a largo plazo son desconocidos, y se sabe poco de las consecuencias que se asociarán con futuros esfuerzos para inducir su diferenciación in vivo, por ejemplo, en cartílago o hueso, o para

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

En otro ejemplo de terapia celular, los linfocitos T transducidos con un ácido nucleico que codificaba un receptor de antígeno quimérico se administraron a pacientes para tratar el cáncer (Zhong, X. S), (2010) *Molecular Therapy* 18:413-420). Por ejemplo, se han usado linfocitos T que expresan un receptor de antígeno quimérico basado en el anticuerpo monoclonal humanizado Trastuzumab (Herceptina) para tratar pacientes con cáncer. Sin embargo, son posibles eventos adversos, y en al menos un caso notificado, la terapia tuvo consecuencias fatales para el paciente (Morgan, R.A. y col., (2010) *Molecular Therapy* 18:843-851). La transducción de las células con un interruptor de seguridad basado en caspasa-9 quimérica, como se presenta en la presente memoria, proporcionaría un interruptor de seguridad que podría evitar el progreso del evento adverso. Por “receptor del antígeno quimérico” o “CAR” se entiende, por ejemplo, un polipéptido quimérico que comprende una secuencia de polipéptidos que reconoce un antígeno diana (un dominio de reconocimiento de antígeno) unido 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 derivarse, por ejemplo, de otras moléculas tales como, por ejemplo, un receptor de linfocitos T o un receptor de reconocimiento del patrón. El dominio intracelular comprende al menos un polipéptido que produce la activación del linfocito T, tal como, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, CD3 zeta y, por ejemplo, moléculas coestimuladoras, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, CD28, OX40 y 4-1BB. El término “receptor de antígeno quimérico” también puede referirse a receptores quiméricos que no se derivan de anticuerpos, pero que son receptores de linfocitos T quiméricos. Estos receptores de linfocitos T quiméricos pueden comprender una secuencia de polipéptidos que reconoce un antígeno diana, en donde la secuencia de reconocimiento puede ser, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, la secuencia de reconocimiento derivada de un receptor de linfocitos T o un scFv. Los polipéptidos de dominio intracelular son aquellos que actúan para activar la célula T. Los receptores de linfocitos T quiméricos se describen, por ejemplo, en Gross, G., y Eshar, Z., *FASEB Journal* 6:3370-3378 (1992), y Zhang, Y., y col., *PLOS Pathogens* 6:1-13 (2010).

Se comprende que por “derivado”, se entiende que la secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos puede derivarse de la secuencia de la molécula. El dominio intracelular comprende al menos un polipéptido que produce la activación del linfocito T, tal como, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, CD3 zeta y, por ejemplo, moléculas coestimuladoras, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, CD28, OX40 y 4-1BB.

En otro ejemplo de terapia celular, los linfocitos T se modifican para que expresen un receptor TGF-beta no funcional, convirtiéndolos en resistentes a TGF-beta. Esto permite que los linfocitos T modificados eviten la citotoxicidad producida por TGF-beta, y que las células se puedan utilizar en terapia celular (Bollard, C. J., y col., (2002) *Blood* 99:3179-3187; Bollard, C. M., y col., (2004) *J. Exptl. Med.* 200:1623-1633). Sin embargo, también podría dar como resultado una linfoma de linfocitos T u otro efecto adverso, ya que los linfocitos T modificados no carecen de parte del control celular normal; estos linfocitos T terapéuticos podrían volverse malignos. Las transducción de estos linfocitos T modificados con un interruptor de seguridad basado en una caspasa-9 quimérica como se presenta en la presente memoria, proporcionaría un interruptor de seguridad que podría evitar el progreso de este resultado.

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 basado en caspasa-9 quimérica antes, después, o al mismo tiempo, a medida que las células se transducen con el gen heterólogo.

Trasplante de citoblastos haploideénticos

Si bien el trasplante de citoblastos ha mostrado ser un medio eficaz para tratar una amplia variedad de enfermedades que involucran hemocitoblastos y su progenie, una deficiencia de donantes histocompatibles ha mostrado ser un impedimento fundamental a una aplicación más amplia del método. La introducción de grandes paneles de donantes de citoblastos no relacionados y/o bancos de sangre del cordón ha ayudado a aliviar el problema, pero muchos pacientes siguen sin ser adecuados para ninguna de las fuentes. Incluso cuando se puede encontrar un donante coincidente, el tiempo transcurrido entre el inicio de la búsqueda y la recogida de los citoblastos normalmente supera los tres meses, un retraso que puede ser fatal en muchos de los pacientes más necesitados. Así, se ha producido un creciente interés en el uso de donantes de familia haploideéntica HLA. Dichos donantes pueden ser padres, hermanos o familiares en segundo grado. El problema del rechazo de los injertos se puede resolver mediante una combinación de acondicionamiento apropiado y grandes dosis de citoblastos, mientras que la enfermedad del injerto contra el hospedador (GvHD) se puede evitar mediante una amplia reducción de los linfocitos T en el injerto del donante. Los resultados inmediatos de tales procedimientos han sido alentadores, con una tasa de injerto >90 % y una tasa de GvHD severa < 10 % para adultos y niños incluso en

ausencia de inmunosupresión posterior al trasplante. Desafortunadamente, la inmunosupresión intensa del procedimiento de injerto, junto con la amplia reducción de linfocitos T y la falta de coincidencia HLA entre el donante y el receptor producen una tasa extremadamente elevada de complicaciones infecciosas posteriores al trasplante, y contribuyen a una elevada incidencia de recaídas de la enfermedad.

La infusión de linfocitos T del donante es una estrategia eficaz para transmitir una inmunidad antiviral y antitumoral después del trasplante de citoblastos alogénicos. La mera readición de linfocitos T a los pacientes después del trasplante haploidéntico, sin embargo, no funciona; 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 del sistema inmunitario mediante la administración de linfocitos T de donantes de los que previamente se han eliminado linfocitos alorreactivos. Un método para lograrlo es estimular los linfocitos T del donante con líneas celulares linfoblastoides (LCL) B transformadas con VEB del paciente. Los linfocitos T alorreactivos regulan positivamente la expresión de CD25, y se eliminan por medio de un conjugado de inmunotoxina de Mab CD25, RFT5-SMPT-dgA. Este compuesto consiste en una IgG1 murina dirigida contra CD25 (cadena alfa del receptor de IL-2) conjugada por medio de un reticulador heterobifuncionalizado [N-succinimidiloxicarbonil-alfa-metil-d-(2-piridilto)tolueno] a la cadena de ricina A deglicosilada (dgA) químicamente.

El tratamiento con la inmunotoxina de CD25 tras la estimulación con LCL reduce >90 % de células alorreactivas. En un estudio clínico en Fase I, utilizando inmunotoxina de CD25 para reducir los linfocitos alorreactivos para reconstitución del sistema inmunitario, se infundieron linfocitos T de donante alorreducidos en 2 niveles de dosis a receptores de SCT haploidénticos con alorreducción de linfocitos T. Se trataron 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 3, 4 y 5 meses después del SCT en comparación con los receptores de 10^4 células/kg/dosis ($p < 0,05$). La recuperación acelerada de linfocitos T se produjo como resultado de la expansión de la población de efectores de memoria (CD45RA(-)CCR-7(-)) ($p < 0,05$), lo que sugiere que es probable que las respuestas de los linfocitos T protectores sean de larga duración. No se detectaron círculos de escisión de la señal conjunta del receptor de células T (TREC) entre los linfocitos T reconstituyentes para los pacientes del nivel de dosis 2, lo que indica que es probable que se hayan derivado de las células alorreducidas infundidas. El espectrotipado de los linfocitos T a los 4 meses demostró una gama Vbeta policlonal. Mediante el uso de ensayos de con tetrámeros y enzimoanálisis de transferencia (Elispot), se observaron respuestas específicas al citomegalovirus (CMV) y al virus de Epstein-Barr (VEB) en 4 de 6 pacientes evaluables en el nivel de dosis 2 incluso en un periodo temprano de 2 a 4 meses después del trasplante, mientras que dichas respuestas no se observaron hasta los 6 a 12 meses entre los pacientes en el nivel de dosis 1. La incidencia de enfermedad del injerto contra el hospedador significativa aguda (2 de 16) y crónica (GvHD; 2 de 15) fue baja. Estos datos demuestran que los linfocitos T del donante alorreducidos pueden usarse de manera segura para mejorar la recuperación de linfocitos T después del SCT haploidéntico. La cantidad de células infundidas posteriormente se aumentó a 10^6 células/kg sin evidencia de GvHD.

Aunque este enfoque reconstituyó la inmunidad antiviral, las recidivas siguieron siendo un problema importante, y 6 pacientes trasplantados por leucemia de alto riesgo experimentaron recidiva y fallecieron por la enfermedad. Por lo tanto, dosis de linfocitos T más altas son útiles para reconstituir la inmunidad antitumoral y para proporcionar esperanza de conseguir un efecto antitumoral, ya que la frecuencia estimada de precursores reactivos a tumores es de 1 a 2 unidades logarítmicas menos que la frecuencia de los precursores reactivos con virus. Sin embargo, en algunos pacientes, estas dosis de células serán suficientes para desencadenar la GvHD incluso después de la alorreducción (Hurley C K, y col., Biol Blood Marrow Transplant 2003;9:610-615; Dey BR, y col., Br.J Haematol. 2006;135:423-437; Aversa F, y col., N Engl J Med 1998;339:1186-1193; Aversa F, y col., J Clin. Oncol. 2005;23:3447-3454; Lang P, Mol. Dis. 2004;33:281-287; Kolb H J, y col., Blood 2004; 103:767-776; Gottschalk S, y col., Annu.Rev. Med 2005;56:29-44; Bleakley M, y col., Nat. Rev. Cancer 2004;4:371-380; Andre-Schmutz I, y col., Lancet 2002;360:130-137; Solomon S R, y col., Blood 2005;106:1123-1129; Amrolia P J, y col., Blood 2006;108:1797-1808; Amrolia P J, y col., Blood 2003; Ghetie V, y col., J Immunol Methods 1991;142:223-230; Mollrem J J, y col., Cancer Res 1999;59:2675-2681; Rezvani K, y col., Clin. Cancer Res. 2005;11:8799-8807; Rezvani K, y col., Blood 2003;102:2892-2900).

Enfermedad del injerto contra el hospedador (GvHD)

La enfermedad del injerto contra el hospedador es una afección que a veces se produce después del trasplante de células inmunocompetentes de donantes, por ejemplo, linfocitos T, a un receptor. Las células trasplantadas reconocen las células del receptor como extrañas, y las atacan y las destruyen. Este problema puede ser un efecto peligroso del trasplante de linfocitos T, especialmente cuando están asociados con citoblastos haploidénticos. Deberían infundirse linfocitos T suficientes para proporcionar los efectos beneficiosos, tales como, por ejemplo, la reconstitución de un sistema inmunitario y el efecto antitumoral del injerto. Sin embargo, el número de linfocitos T que pueden trasplantarse pueden estar limitado por el problema de que el trasplante dé como resultado una enfermedad del injerto contra el hospedador grave.

La enfermedad del injerto contra el hospedador se puede estadificar como se indica en las siguientes tablas:

Tabla 1

Estadificación

	Etapa 0	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3	Etapa 4
Piel	Sin erupción cutánea	Erupción cutánea <25 % BSA	25-50 %	>50 % Eritroderma generalizado	Más vesículas ampollosas y descamación
Intestino (para pacientes pediátricos)	diarrea <500 ml/día	501-1000 ml/día 5 cc/kg-10 cc/kg/día	1001-1500 ml/día 10 cc/kg-15 cc/kg/día	>1500 ml/>día 15 cc/kg/día	Dolor abdominal grave e íleo
UGI		Náuseas/vómitos graves			
Hígado	2 mg de bilirrubina/di	2,1-3 mg/di	3,1-6 mg/di	6,1-15 mg/di	>15 mg/di

La puntuación de GvHD aguda se puede realizar mediante el criterio de la conferencia de consenso (Przepiorka D y col., 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. Bone Marrow Transplant 1995; 15:825-828).

5

Índice puntuación de GvHD aguda

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

Caspasa inducible 9 como “interruptor de seguridad” para terapia celular y para trasplante celular genéticamente modificado

10

Por reducir el efecto de la enfermedad del injerto contra el hospedador se entiende, por ejemplo, una disminución en los síntomas de GvHD para que el paciente pueda asignarse a una etapa de nivel inferior o, por ejemplo, una reducción de un síntoma de la enfermedad del injerto contra el hospedador de al menos un 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 %. Una reducción del efecto de la enfermedad del injerto contra el hospedador también puede medirse por la detección de una reducción en los linfocitos T activados implicados en la reacción GvHD, tal como, por ejemplo, una reducción de células que expresan el marcador de proteína, 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 %.

15

En la presente memoria se proporciona una estrategia alternativa con genes suicidas que se basa en moléculas proapoptóticas humanas fusionadas con una variante de FKBP optimizada para unir un inductor de dimerización químico (CID) (Clackson T, y col., Proc Natl Acad Sci USA. 1998, 95:10437-10442), m AP1903, un fármaco sintético que ha mostrado ser seguro en voluntarios sanos (Luliucci J D, y col., J Clin Pharmacol. 2001, 41:870-879). La administración de esta molécula pequeña produce la reticulación y la activación de las moléculas diana proapoptóticas. La aplicación de este sistema inducible en linfocitos T humanos se ha explorado usando Fas o el dominio efector de muerte (DED) de la proteína que contiene el dominio de muerte asociado a FA (FADD) como moléculas proapoptóticas. Hasta un 90 % de los linfocitos T transducidos con estas moléculas de muerte inducibles experimentaron apoptosis después de la administración de CID (Thomis D C, y col., Blood. 2001, 97:1249-1257; Spencer D M, y col., Curr Biol. 1996, 6: 839-847; Fan L, y col., Hum Gene Ther. 1999, 10: 2273-2285; Berger C, y col., Blood. 2004, 103:1261-1269; Junker K, y col., Gene Ther. 2003, 10:1189-197). Esta estrategia de genes suicidas se puede usar en cualquier célula adecuada usada en terapia celular, incluidos, por ejemplo, hemocitoblastos y otras células precursoras, incluidas, por ejemplo, células del estroma mesenquimal, embriocitoblastos, y citoblastos pluripotentes inducibles.

20

25

30

Por lo tanto, este interruptor de seguridad, catalizado por caspasa-9, puede usarse cuando existe una dolencia en el paciente de terapia celular que requiere la eliminación de las células terapéuticas transfectadas o transducidas. Las células terapéuticas incluyen, por ejemplo, cualquier célula utilizada para tratamiento terapéutico de una enfermedad o dolencia e incluyen, por ejemplo, células terapéuticas seleccionadas del grupo que consiste en hemocitoblastos, células precursoras inducibles (IPS), embriocitoblastos (es), citoblastos mesenquimales, células plasmáticas (B), miocitos y linfocitos T. Las dolencias en las que puede ser necesario eliminar células incluyen, por ejemplo, GvHD, la diferenciación inapropiada de las células en células más maduras de tipo celular o tisular erróneo, y otras toxicidades. Para activar el interruptor caspasa-9 en el caso de una diferenciación inapropiada, es posible usar promotores específicos de tejido. Por ejemplo, cuando una célula precursora se diferencia a osteocitos y adipocitos, y los adipocitos no se desean, el vector utilizado para transfectar o transducir la célula precursora puede tener un promotor específico de adipocito que está operativamente unido a la secuencia de nucleótidos de la caspasa-9. De esta manera, si las células se diferencian en adipocitos, tras la administración del ligando multimérico, se debería conseguir como resultado la apoptosis de los adipocitos diferenciados inadecuadamente.

35

40

45

Los métodos se pueden usar, por ejemplo, para cualquier trastorno que se pueda aliviar mediante terapia celular, incluido el cáncer, cáncer de la sangre o médula ósea, otras enfermedades transmitidas por la sangre o médula ósea tales como anemia drepanocítica y leucodistrofia metracrómica, y cualquier trastorno que se pueden aliviar mediante un trasplante de citoblastos, por ejemplo trastornos de la sangre o médula ósea tales como anemia drepanocítica o leucodistrofia metracrómica.

La eficacia de la inmunoterapia adoptiva puede potenciarse convirtiendo los linfocitos T terapéuticos en resistentes a las estrategias de evasión inmunitaria empleadas por las células tumorales. Se ha comprobado en estudios in vitro que esto se puede lograr por transducción con un receptor dominante negativo o una citocina inmunomoduladora (Bollard C M, y col., Blood. 2002, 99:3179-3187; Wagner H J, y col., Cancer Gene Ther. 2004, 11:81-91). Además, la transferencia de receptores de linfocitos T específicos del antígeno permite la aplicación de la terapia con linfocitos T a una gama más amplia de tumores (Pule M, y col., Cytotherapy. 2003, 5:211-226; Schumacher T N, Nat Rev Immunol. 2002, 2:512-519). Un sistema suicida para linfocitos T humanos diseñados mediante ingeniería genética se ha desarrollado y sometido a ensayo para permitir el uso posterior en estudios clínicos. La caspasa-9 se ha modificado y se ha comprobado que se expresa de manera estable en linfocitos T humanos sin alterar negativamente sus características funcionales y fenotípicas a la vez que se demuestra sensibilidad frente a CID, incluso en linfocitos T que tienen moléculas antiapoptóticas reguladas positivamente. (Straathof, K. C., y col., 2005, Blood 105:4248-54).

En las células genéticamente modificadas usadas en la terapia génica, el gen puede ser una secuencia de polinucleótidos heteróloga derivada de una fuente distinta a la célula que se usa para expresar el gen. El gen se deriva de una fuente procariota o eucariota, tal como una bacteria, un virus, una levadura, un parásito, una planta o incluso un animal. El ADN heterólogo también se deriva de más de una fuente, es decir, una construcción multigénica o una proteína de fusión. El ADN heterólogo puede incluir también una secuencia reguladora, que se deriva de una fuente y el gen de una fuente diferente. O bien, 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 que no son caspasa-9 que se pueden codificar mediante los polipéptidos quiméricos de la tecnología actual incluyen, por ejemplo, caspasa-1, caspasa-3 y caspasa-8. Se pueden encontrar análisis de estos polipéptidos de caspasa en, por ejemplo, MacCorkle, R. A., y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1998) 95:3655-3660; y Fan, L., y col. (1999) Human Gene Therapy 10:2273-2285).

Construcciones de expresión diseñadas mediante ingeniería genética

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 ellos pueden estar unidos operativamente. Para los fines de esta descripción, y en general para las referencias al polipéptido de caspasa-9, se entiende que la expresión "polipéptido de caspasa-9" incluye referencias generales a polipéptidos de caspasa-9 modificados.

En general, se entiende que la expresión "unido operativamente" indica que la secuencia promotora está funcionalmente unida a una segunda secuencia, en donde, por ejemplo, la secuencia promotora inicia y media la transcripción del ADN que corresponde a la segunda secuencia. El polipéptido de caspasa-9 puede ser de longitud completa o estar truncada. El polipéptido marcador puede estar unido al polipéptido de caspasa-9. Por ejemplo, el polipéptido marcador se puede unir al polipéptido de caspasa-9 mediante una secuencia polipeptídica, tal como, por ejemplo, una secuencia escindible análoga a 2A. El polipéptido marcador puede ser, por ejemplo, CD19, Δ 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 puede 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 unido al polipéptido de caspasa-9 mediante una secuencia polipeptídica, tal como, por ejemplo, una secuencia escindible análoga a 2A.

Las secuencias análogas a 2A, o secuencias 2A "escindibles", se derivan de, por ejemplo, muchos virus diferentes, que incluyen, por ejemplo, de Thosea asigna. Estas secuencias también se conocen a veces como "secuencias que omiten péptidos". Cuando este tipo de secuencia se introduce en un cistrón, entre dos péptidos que están previstos para separarse, el ribosoma aparece saltar 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 utiliza esta secuencia, el péptido que se codifica en 5' de la secuencia 2A puede finalizar con aminoácidos adicionales en el extremo carboxi, incluido el resto Gly y cualquier resto en dirección 5' de la secuencia 2A. El péptido que se codifica en 3' de la secuencia 2A puede finalizar con aminoácidos adicionales en el extremo amino, incluido el resto Pro y cualquier resto en dirección 3' de la secuencia 2A. Las secuencias "2A" o "análoga a 2A" son parte de una gran familia de péptidos que pueden

producir saldo de enlace peptídico. Se han caracterizado diversas secuencias 2A (p. ej., F2A, P2A, T2A), y son ejemplos de secuencias análogas a 2A que se pueden utilizar en los polipéptidos de la presente descripción.

La construcción de expresión se puede insertar en un vector, por ejemplo, un vector o plásmido vírico. Las etapas de los métodos proporcionados pueden realizarse usando cualquier método adecuado; estos métodos incluyen, de forma no limitativa, métodos para transducir, transformar o proporcionar de cualquier otra forma ácido nucleico a la célula presentadora de antígenos, presentados en la presente memoria. El polipéptido de caspasa-9 truncado se puede codificar mediante la secuencia de nucleótidos de la Id. de sec. n.º 8, Id. de sec. n.º 23, Id. de sec. n.º 25, Id. de sec. n.º 27, o un fragmento funcionalmente equivalente de las mismas, con o sin enlazadores de ADN, o tiene la secuencia de aminoácidos de la Id. de sec. n.º 9, Id. de sec. n.º 24, Id. de sec. n.º 26, o la Id. de sec. n.º 28 o un fragmento funcional equivalente de las mismas. El polipéptido CD19 se pueden codificar mediante la secuencia de nucleótidos de la Id. de sec. n.º 14, o un fragmento funcionalmente equivalente de la misma, con o sin enlazadores de ADN, o tiene la secuencia de aminoácidos de la Id. de sec. n.º 15, o un fragmento funcional equivalente de las mismas. Un fragmento funcionalmente equivalente del polipéptido de caspasa-9 tiene sustancialmente la misma capacidad de la apoptosis que el polipéptido de la Id. de sec. n.º 9, con al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % de la actividad del polipéptido de la Id. de sec. n.º 9. Un fragmento funcionalmente equivalente del polipéptido CD19 tiene sustancialmente la misma capacidad que el polipéptido de la Id. de sec. n.º 15, para actuar como un marcador que se puede usar para identificar y seleccionar células transducidas o transfectadas, detectándose al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % del polipéptido marcador cuando se compara con el polipéptido de la Id. de sec. n.º 15, usando técnicas de detección estandarizadas.

Más especialmente, se puede usar más de un dominio de unión a ligando o región de multimerización en la construcción de expresión. También además, la construcción de expresión contiene una secuencia dirigida a membrana. Las construcciones de expresión adecuadas pueden incluir un elemento polipéptido coestimulador en ambos lados de los elementos de unión a ligando de FKBP anteriores.

Regiones de unión a ligando

El dominio de unión a ligando (“dimerización”), o región de multimerización, de la construcción de expresión puede ser cualquier dominio conveniente que permita la inducción utilizando un ligando natural o no natural, por ejemplo, un ligando sintético no natural. La región de multimerización puede ser interna o externa a la membrana celular, dependiendo de la naturaleza de la construcción y la elección del ligando. Se conoce una amplia variedad de proteínas de unión a ligandos, incluidos receptores, que incluyen proteínas de unión a ligandos asociadas con las regiones citoplasmáticas indicadas anteriormente. Como se utiliza en la presente memoria, el término “dominio de unión a ligando” puede utilizarse de manera indistinta con el término “receptor”. Son de particular interés las proteínas de unión a ligando para las cuales se conocen ligandos (por ejemplo, ligandos orgánicos pequeños) o se pueden producir fácilmente. Estos dominios de unión a ligando o receptores incluyen receptores de las FKBP y de ciclofilina, los otros receptores de esteroides, el receptor de tetraciclina, el resto de receptores indicados anteriormente, y similares, así como receptores “no naturales”, que se pueden obtener a partir de anticuerpos, especialmente de la subunidad de cadena pesada o ligera, secuencias mutadas de las mismas, secuencias de aminoácidos aleatorias obtenidas por procedimientos estocásticos, síntesis combinatoria, y similares. La región de unión a ligando se puede seleccionar del grupo que consiste en la región de unión a ligando de FKBP, región de unión al ligando del receptor de ciclofilina, región de unión al ligando del receptor de esteroides, región de unión al ligando del receptor de ciclofilina y región de unión al ligando del receptor de tetraciclina. Frecuentemente, la región de unión al ligando comprende una secuencia $F_V F_{VIS}$. A veces, la secuencia $F_V F_{VIS}$ además comprende una secuencia F_V adicional. Los ejemplos incluyen, por ejemplo, los analizados en Kopytek, S. J., y col., *Chemistry & Biology* 7:313-321 (2000) y en Gestwicki, J. E., y col., *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., y col., eds., Wiley, 2007)).

Para la mayor parte, los dominios de unión a ligando o dominios del receptor tendrán al menos aproximadamente 50 aminoácidos, y menos de aproximadamente 350 aminoácidos, habitualmente menos de 200 aminoácidos, bien como el dominio natural o como la porción activa truncada del mismo. El dominio de unión puede ser, por ejemplo, pequeño (<25 kDa, para permitir la transfección eficaz en vectores víricos), monomérico, no inmunógeno, tener ligandos no tóxicos disponibles sintéticamente con permeabilidad celular que se pueden configurar para la dimerización.

El dominio receptor puede ser intracelular o extracelular dependiendo del diseño de la construcción de expresión y la disponibilidad de un ligando apropiado. Para los ligandos hidrófobos, el dominio de unión puede estar en cualquier lado de la membrana, pero para los ligandos hidrófilos, en particular los ligandos proteicos, el dominio de unión será normalmente externo a la membrana celular, salvo que exista un sistema de transporte para internalizar el ligando en una forma en la que esté disponible para la unión. Para un receptor intracelular, la construcción puede codificar un péptido señal y un dominio transmembrana en 5' o 3' de la secuencia del dominio receptor o puede tener una secuencia señal de unión a lípido en 5' de la secuencia del dominio receptor. Cuando el dominio receptor está entre el péptido señal y el dominio transmembrana, el dominio receptor será extracelular.

La porción de la construcción de expresión que codifica el receptor puede estar sujeta a mutagénesis por una variedad de motivos. La proteína mutagenizada puede proporcionar una afinidad de unión más alta, permitir la

discriminación mediante el ligando entre el receptor de origen natural y el receptor mutagenizado, lo que proporciona oportunidades para diseñar un par ligando-receptor, o similares. El cambio en el receptor puede implicar cambios en los aminoácidos conocidos por estar en el sitio de unión, mutagénesis aleatoria utilizando técnicas combinatorias, donde los codones de los aminoácidos asociados con el sitio de unión u otros aminoácidos asociados con cambios conformacionales pueden estar sujetos a mutagénesis cambiando los codon(es) del aminoácido en particular, tanto con cambios conocidos como de manera aleatoria, expresando las proteínas resultantes en un hospedador procarionta adecuado y a continuación cribando las proteínas resultantes para determinar la unión.

Como dominio de unión, se pueden usar anticuerpos y subunidades de anticuerpos, por ejemplo, la cadena pesada o ligera, particularmente los fragmentos, más particularmente, todo o parte de la región variable, o fusiones de la cadena pesada y ligera para crear una unión de alta afinidad. Los anticuerpos que se contemplan incluyen los que son un producto humano expresado de forma tónica, tal como un dominio extracelular que no desencadenaría una respuesta inmunitaria y que generalmente no se expresa en la periferia (es decir, fuera del área del SNC/cerebro). Estos ejemplos incluyen, aunque no de forma limitativa, el receptor del factor de crecimiento del nervio de baja afinidad (LNGFR) y proteínas superficiales embrionarias (es decir, antígeno carcinoembrionario).

Adicionalmente, se pueden preparar anticuerpos contra moléculas hapténicas que sean fisiológicamente aceptables, y cribarse las subunidades de anticuerpos individuales según la afinidad de unión. El ADNc que codifica las subunidades puede aislarse y modificarse por delección de la región constante, porciones de la región variable, mutagénesis de la región variable, o similares, para obtener un dominio de unión a proteína que tiene la afinidad apropiada por el ligando. De esta manera, se puede emplear casi cualquier compuesto hapténico fisiológicamente aceptable como ligando o proporcionar un epítipo para el ligando. En vez de unidades de anticuerpos, se pueden emplear receptores naturales, para los que se conoce el dominio de unión y existe un ligando útil para la unión.

25 Oligomerización

La señal transductora normalmente surgirá de la oligomerización mediada por ligandos de las moléculas de proteína quimérica, es decir, como resultado de la oligomerización después de la unión del ligando, aunque pueden emplearse otros eventos de unión, por ejemplo, la activación alostérica, para iniciar una señal. La construcción de la proteína quimérica variará en función del 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 receptores de las proteínas quiméricas de la membrana superficial será habitualmente multimérico en el sentido que tendrá al menos dos sitios de unión, donde cada uno de los sitios de unión es capaz de unirse al dominio del receptor del ligando. Por "región de unión a ligando multimérico", se entiende una región de unión a ligando que se une a un ligando multimérico. El término "ligandos multiméricos" incluye ligandos dimericos. Un ligando dimerico tendrá dos sitios de unión con capacidad de unirse al dominio del receptor del ligando. De forma deseable, los ligandos sujeto serán un dímero o un oligómero de orden mayor, habitualmente no mayor de aproximadamente tetramérico, de moléculas orgánicas sintéticas pequeñas, teniendo las moléculas individuales de forma típica al menos aproximadamente 150 Da y menos de aproximadamente 5 kDa, normalmente menos de aproximadamente 3 kDa. Se puede emplear una variedad de parejas de ligandos y receptores sintéticos. Por ejemplo, en aspectos que implican receptores naturales, el FK506 dimerico se puede usar con un receptor de FKBP12, la ciclosporina A dimerizada se puede usar con el receptor de ciclofilina, el estrógeno dimerizado con un receptor de estrógenos, los glucocorticoides dimerizados con un receptor de glucocorticoides, la tetraciclina dimerizada con el receptor de la tetraciclina, la vitamina D dimerizada con el receptor de la vitamina D, y similares. Alternativamente, se pueden usar órdenes mayores de los ligandos, p. ej., triméricos. Para los aspectos que implican receptores no naturales, p. ej., se pueden usar subunidades de anticuerpos, subunidades de anticuerpos modificados, anticuerpos monocatenarios formados por regiones variables de cadena pesada y ligera en tándem, separadas por un dominio enlazador flexible, o receptores modificados, y secuencias mutadas de los mismos, y similares, cualquiera de una gran variedad de compuestos. Una característica significativa de estas unidades de ligando es que cada sitio de unión pueden unirse al receptor con alta afinidad y puede dimerizarse químicamente. También están disponibles métodos para equilibrar la hidrofobicidad/hidrofilicidad de los ligandos para que puedan disolverse en suero en niveles funcionales e incluso difundirse a través de las membranas plasmáticas para la mayoría de las aplicaciones.

Los métodos descritos en la presente memoria pueden utilizar la técnica de dimerización químicamente inducida (CID) para producir una proteína o polipéptido controlado condicionalmente. Esta técnica, además de ser inducible, también es reversible, debido a la degradación del agente de dimerización lábil o la administración de un inhibidor competitivo monomérico.

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

señalización hacia la membrana plasmática para estimular la señalización (Spencer D. M. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995, 92:9805-9809; Holsinger, L. J. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995, 95:9810-9814).

5 El sistema CID se basa en la noción de que la agregación del receptor superficial activa eficazmente las cascadas de señalización posteriores. En el caso más simple, el sistema CID utiliza un análogo dimérico del fármaco supresor permeable a lípidos, FK506, que pierde su bioactividad normal al mismo tiempo que gana la capacidad de reticular las moléculas genéticamente fusionadas a la proteína de unión a FK506, FKBP12. Mediante la fusión de una o más FKBP a la caspasa-9, se puede estimular la actividad de caspasa-9 de una forma dependiente del fármaco dimerizador, pero de una forma independiente del ectodominio y del ligando. Esto proporciona al sistema control temporal, utilizando
10 análogos de fármacos monoméricos, y una especificidad potenciada. La elevada 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 a través de FKBP12 endógeno. También pueden usarse las variantes FKBP12 que tienen sustituciones y deleciones de aminoácidos, tales como FKBP12v36, que se une a un fármaco dimerizador. Además, los ligandos sintéticos son resistentes a la degradación con proteasas,
15 convirtiéndolos en más eficaces para activar receptores in vivo que la mayoría de los agentes proteicos administrados.

Los ligandos utilizados pueden unirse a dos o más de los dominios de unión al ligando. Las proteínas quiméricas pueden unirse a más de un ligando cuando contienen más de un dominio de unión a ligando. El ligando es, por lo general, una sustancia no proteica o una sustancia química. Ligandos ilustrativos incluyen, aunque no de forma limitativa, FK506 (p. ej., FK1012).

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

F36V'-FKBP: F36V'-FKBP es una versión de codón inestable de F36V-FKBP. Codifica la secuencia del polipéptido idéntico a F36V-FKBP, pero solamente tiene un 62 % de homología en la secuencia de nucleótidos. F36V'-FKBP se ha diseñado para reducir la recombinación de vectores retrovíricos (Schellhammer, P. F. y col., J. Urol. 157, 1731-5 (1997)). F36V'-FKBP se construyó utilizando un procedimiento de ensamblaje de la PCR. El transgén contiene una copia de F36V'-FKBP unida directamente a una copia de F36V-FKBP.

35 El ligando puede ser una molécula pequeña. Se puede seleccionar el ligando adecuado para la región de unión a ligando seleccionada. Frecuentemente, el ligando es dimérico, a veces el ligando es un FK506 dimérico o un análogo de FK506 dimérico. El ligando puede ser AP1903 (N.º índice CAS: ácido 2-piperidinacarboxílico, 1-[(2S)-1-oxo-2-(3,4,5-trimetoxifenil)butil]-, 1,2-etanodiolbis[imino(2-oxo-2,1-etanodiol)oxi-3,1-fenil]-(1R)-3-(3,4-dimetoxifenil)propiliden]] éster, [2S-[1(R*),2R*[S*[S*[1(R*),2R*]]]]-(9CI) número de Registro CAS: 195514-63-7; Fórmula Molecular: C78H98N4O20
40 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 adecuados para el FKBP12, y ciertos análogos adecuados para la versión inestable de FKBP12. Una región de unión a ligando puede incluirse en la proteína quimérica. Se pueden incluir dos o más regiones de unión a ligando. Cuando, por ejemplo, la región de unión al ligando es FKBP12, cuando dos de estas regiones se han incluido, una puede ser, por ejemplo, la versión inestable.

Otros sistemas de dimerización contemplados incluyen el sistema de cumermicina/ADN girasa. La dimerización inducida por cumermicina activa una proteína Raf modificada y estimula la cascada de la cinasa MAP. Véase Farrar y col., 1996.

AP1903 para inyección

50 AP1903 se fabrica por Alphora Research Inc. y la especialidad farmacéutica inyectable AP1903 se fabrica por Formatech Inc. Se formula como una solución de 5 mg/ml de AP1903 en una solución al 25 % en el solubilizante no iónico HS 15 (250 mg/ml, BASF). A temperatura ambiente, esta formulación es una solución transparente ligeramente amarilla. Después de la refrigeración, esta formulación experimenta una transición de fase reversible, dando como resultado una solución turbia. Esta transición de fase se revierte al recalentar a temperatura ambiente. La carga es de 2,33 ml en un vial de vidrio de 3 mg (~10 mg de AP1903 para inyección total por vial).

60 AP1903 se extrae del refrigerador la noche antes de que el paciente reciba la dosis y se almacena a una temperatura de aproximadamente 21 °C durante la noche, de manera que la solución se aclara antes de la dilución. La solución se prepara en los 30 minutos anteriores a iniciar la infusión en frascos de vidrio o de polietileno o bolsas sin 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 la luz y calor excesivos, y se almacenaron en un área cerrada con acceso restringido.

65

Tras determinar la necesidad de administrar AP1903 e inducir el polipéptido de caspasa-9 inducible, los pacientes pueden recibir, por ejemplo, una única dosis fija de AP1903 inyectable (0,4 mg/kg) mediante infusión IV durante 2 horas, utilizando un conjunto de infusión esterilizado sin DEHP ni óxido de etileno. La dosis de AP1903 se calcula individualmente para todos los pacientes y no se recalcula salvo que el peso corporal varíe en $\geq 10\%$. La dosis calculada se diluye en 100 ml de solución salina normal al 0,9 % antes de la infusión.

En un estudio en Fase I anterior sobre AP1903, 24 voluntarios sanos se trataron con dosis individuales de AP1903 inyectable a niveles de dosis de 0,01, 0,05, 0,1, 0,5 y 1,0 mg/kg para infusión IV durante 2 horas. Los niveles de AP1903 de plasma fueron directamente proporcionales a la dosis, con valores de $C_{\text{máx}}$ promedio comprendidos de aproximadamente 10-1275 ng/ml para el intervalo de dosis de 0,01-1,0 mg/kg. Después del período de infusión inicial, las concentraciones en sangre demostraron una fase de distribución rápida, con niveles plasmáticos reducidos hasta aproximadamente un 18, 7 y 1 % de concentración máxima a 0,5, 2 y 10 horas después de la dosis, respectivamente. Se comprobó que AP1903 inyectable era seguro y bien tolerado para todos los niveles de dosis y demostró un perfil farmacocinético favorable. Lulicci J D, y col., J Clin Pharmacol. 41: 870-9, 2001.

La dosis fija de AP1903 inyectable utilizada puede, por ejemplo, infundirse por vía intravenosa a 0,4 mg/kg durante 2 horas. La cantidad de AP1903 necesaria in vitro para una señalización eficaz de las células es de 10-100 nM (1600 Da MW). Esto equivale a 16-160 $\mu\text{g/l}$ o $\sim 0,016\text{-}1,6\text{ mg/kg}$ (1,6-160 $\mu\text{g/kg}$). Las dosis de hasta 1 mg/kg fueron bien toleradas en el estudio en Fase I de AP1903 descrito anteriormente.

Marcadores seleccionables

Las construcciones de expresión pueden contener construcciones de ácidos nucleicos cuya expresión se identifica in vitro o in vivo incluyendo un marcador detectable en la construcción de expresión. Dichos marcadores transmiten un cambio identificable a la célula, lo que permite una fácil identificación de las células que contienen la construcción de expresión. Normalmente, la inclusión de un fármaco marcador de selección ayuda en la selección y la clonación de transformantes. Por ejemplo, los genes que transmiten resistencia a neomicina, puromicina, higromicina, DHFR, GPT, zeocina e histidinol son marcadores seleccionables útiles. Como alternativa, se emplean enzimas tales como la timidina quinasa (tk) del virus del herpes simple. Los marcadores de superficie inmunitarios que contienen dominios extracelulares no de señalización o diversas proteínas (p. ej. CD34, CD19, LNGFR) también pueden emplearse, lo que permite un método sencillo para la clasificación magnética o de fluorescencia mediada por anticuerpos. No se cree que el marcador seleccionable empleado es importante, siempre que pueda expresarse simultáneamente con el ácido nucleico que codifica un producto génico. Otros ejemplos de marcadores seleccionables incluyen, por ejemplo, indicadores tales como GFP, EGFP, beta-gal o cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). La proteína marcadora, tal como, por ejemplo, CD19 puede utilizarse para seleccionar las células para transfusión, tal como, por ejemplo, en selección inmunomagnética.

Regiones de control

Promotores

No se considera que sea importante el promotor concreto empleado para controlar la expresión de una secuencia de polinucleótidos de interés, siempre que pueda dirigir la expresión del polinucleótido en la célula diana. Así, cuando una célula humana es la diana, la región codificante de la secuencia de polinucleótidos puede situarse, por ejemplo, adyacente y bajo el control de un promotor que puede expresarse en una célula humana. En términos generales, dicho promotor podría incluir un promotor humano o vírico.

El promotor del gen temprano inmediato del citomegalovirus humano (CMV), el promotor temprano del SV40, la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous, la β -actina, el promotor de insulina de rata y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, se pueden utilizar para obtener una expresión de alto nivel de la secuencia codificante de interés. También se contempla el uso de otros promotores de células de mamíferos o de fagos bacterianos que son bien conocidos en la materia para conseguir la expresión de una secuencia codificante, siempre que los niveles de expresión sean suficientes para un fin dado. Cuando se utiliza un promotor con propiedades bien conocidas, se puede optimizar el nivel y el patrón de expresión de la proteína de interés después de la transfección o transformación.

La selección de un promotor que se regula en respuesta a señales fisiológicas o fisiológicas específicas puede permitir la expresión inducible del producto génico. Por ejemplo, en el caso de utilizar la expresión de un transgén, o de transgenes cuando se utiliza un vector multicistrónico, que sea tóxica para las células en las que el vector se produce, es deseable evitar o reducir la expresión de uno o más de los transgenes. Los ejemplos de transgenes que son tóxicos para la línea celular productora son los genes proapoptóticos y de citocinas. Están disponibles algunos sistemas promotores inducibles para la producción de vectores víricos cuando los productos transgénicos son tóxicos (añadidos a promotores más inducibles).

El sistema de la ecdisona (Invitrogen, Carlsbad, Ca) es uno de estos sistemas. Este sistema está diseñado para permitir la expresión regulada de un gen de interés en células de mamíferos. Consiste en un mecanismo de expresión estrechamente regulado que permite prácticamente que no se produzca la expresión basal del nivel del

transgén sino una inducibilidad de 200 veces. El sistema se basa en el receptor heterodimérico de la ecdisona de *Drosophila*, y cuando la ecdisona o un análogo tal como muristerona A se une al receptor, el receptor activa un promotor que activa a su vez la expresión del transgén posterior de forma que se alcanzan elevados 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 impulsa la expresión del gen de interés está en otro plásmido. Por lo tanto, el diseño mediante ingeniería genética de este tipo de sistemas en el vector de transferencia genética sería de utilidad. La transfección simultánea de plásmidos que contienen el gen de interés y de los monómeros del receptor en la línea de células productoras podría a continuación permitir la producción del vector de transferencia genética sin la expresión de un transgén potencialmente tóxico. En el momento adecuado, la expresión del transgén se podría activar con ecdisona o muristerona A.

Otro sistema inducible que puede ser de utilidad es el sistema Tet-Off™ o Tet-On™ (Clontech, Palo Alto, CA) originalmente desarrollado por Gossen y Bujard (Gossen y Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551, 1992; Gossen y col., Science, 268:1766-1769, 1995). Este sistema permite también elevados niveles de expresión génica que se van a regular en respuesta a la tetraciclina o a 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 se basan en dos elementos reguladores derivados del operón de resistencia a tetraciclina de *E. coli*, la secuencia operadora de tetraciclina a la que se une el represor de la 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 transactivador controlado por tetraciclina, que está compuesto, en el sistema Tet-Off™, por el dominio VP16 del virus del herpes simple y el represor de tetraciclina natural. Por lo tanto, en ausencia de doxiciclina, la transcripción se activa constitutivamente. En el sistema Tet-On™, el represor de tetraciclina no natural y, en presencia de doxiciclina, activa la transcripción. En la producción de vectores para terapia génica, el sistema Tet-Off™ puede usarse de manera que las células productora podrían cultivarse en presencia de tetraciclina o doxiciclina y evitar la expresión de un transgén potencialmente tóxico, pero cuando el vector se introduce en el paciente, la expresión génica se activará constitutivamente.

En algunas circunstancias, es deseable regular la expresión de un transgén en un vector de terapia génica. Por ejemplo, se usan promotores víricos diferentes con diversas resistencias de actividad dependiendo del nivel de expresión deseado. En células de mamíferos, el promotor temprano inmediato del CMV se usa frecuentemente para proporcionar una activación de la transcripción intensa. El promotor CMV se revisa en Donnelly, J. J. y col., 1997. Annu. Rev. Immunol. 15:617-48. Se han usado también versiones modificadas del promotor del CMV que son menos potentes cuando se desean niveles de expresión reducidos del transgén. Cuando se desea la expresión de un transgén en células hematopoyéticas, se utilizan frecuentemente promotores retrovíricos tales como los LTR del VLM o del VTMM. Otros promotores víricos que se utilizan dependiendo del efecto deseado incluyen SV40, LTR del VRS, LTR del VIH-1 y VIH-2, promotores adenovíricos tales como los derivados de la E1A, E2A, o la región MLP, LTR del VAA, VHS-TK, y virus del sarcoma aviar.

En otros ejemplos, se pueden seleccionar promotores que estén regulado por el desarrollo y sean activos en células diferenciadas concretas. Así, por ejemplo, puede que un promotor no sea activo en un citoblasto pluripotente pero, por ejemplo, cuando el citoblasto pluripotente se diferencia a una célula más madura, el promotor puede entonces activarse.

Similarmente, se usan promotores específicos del tejido para efectuar la transcripción en tejidos o células específicos para reducir la toxicidad potencial o efectos no deseados en tejidos no diana. Estos promotores pueden producir una expresión reducida en comparación con un promotor más fuerte, tal como el promotor del CMV, pero también puede producir una expresión más limitada e inmunogenicidad (Bojak, A., y col., 2002. Vaccine. 20:1975-79; Cazeaux., N., y col., 2002. Vaccine 20:3322-31). Por ejemplo, se pueden utilizar promotores específicos del tejido tales como el promotor asociado a PSA o calicreína glandular específica de próstata, o el gen de la creatina quinasa muscular, cuando resulte apropiado.

Los ejemplos de promotores específicos del tejido o de la diferenciación incluyen, aunque no de forma limitativa, los siguientes: B29 (linfocitos B); CD14 (linfocitos monocíticos); CD43 (leucocitos y plaquetas); CD45 (células hematopoyéticas); CD68 (macrófagos); desmina (muscular); elastasa-1 (células acinares pancreáticas); endogлина (células endoteliales); fibronectina (células en diferenciación, tejidos en cicatrización); y Flt-1 (células endoteliales); GFAP (astrocitos).

En ciertas indicaciones, es deseable activar la transcripción en momentos específicos después de administrar el vector de terapia génica. Esto se hace con promotores tales como los que se regulan mediante hormonas o citocinas. Los promotores sensibles a citocinas y proteínas inflamatorias que se pueden usar incluyen quinínogeno K y T (Kageyama y col. (1987) J. Biol. Chem., 262, 2345-2351), c-fos, TNF-alfa, proteína C reactiva (Arcone y col., (1988) Nucl. Acids Res., 16(8), 3195-3207), haptoglobina (Oliviero y col., (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 y col., (1990) Mol. Cell. Biol., 6:181-6191), IL-8, glicoproteína ácida alfa-1 (Prowse y Baumann, (1988) Mol Cell Biol, 8, 42-51), alfa-1-antitripsina, lipoproteína lipasa (Zechner y col., Mol. Cell. Biol., 2394-2401, 1988), angiotensinógeno (Ron, y col., (1991) Mol. Cell. Biol., 2887-2895), fibrinógeno, c-jun (inducible mediante ésteres de forbol, TNF-alfa, radiación UV, ácido retinoico y peróxido de hidrógeno), colagenasa (inducida por ésteres de forbol y ácido retinoico), metalotioneína (inducible por metales pesados y glucocorticoides), estromelina (inducible por ésteres de forbol, interleucina-1 y EGF), alfa-2 macroglobulina y alfa-1 anti-

quimotripsina. Otros promotores incluyen, por ejemplo, SV40, VTMM, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de Moloney (MV), VLA, virus de Epstein Barr, virus del sarcoma de Rous, actina humana, miosina, hemoglobina y creatina.

5 Se contempla que cualquiera de los promotores anteriores solos o en combinación con otro pueden ser útiles dependiendo de la acción deseada. Los promotores y otros elementos reguladores se seleccionan de forma que sean funcionales en las células o tejidos deseados. Además, esta lista de promotores no debe interpretarse como exhaustiva o limitante; otros promotores se usan junto con los promotores y métodos descritos en la presente memoria.

10 Potenciadores

10 Los potenciadores son elementos genéticos que aumentan la transcripción de un promotor ubicado en una posición distante en la misma molécula de ADN. Los ejemplos iniciales incluyen los potenciadores asociados con los receptores de la inmunoglobulina y linfocitos T que flanquean la secuencia codificante y se encuentran dentro de varios intrones. Muchos
15 promotores víricos, tales como el CMV, SV40 y lo LTR retrovíricos están estrechamente asociados con la actividad potenciadora y se tratan frecuentemente como elementos individuales. Los potenciadores están organizados de forma muy similar a los promotores. Es decir, están compuestos de muchos elementos individuales, cada uno de los cuales se une a una o más proteínas transcripcionales. La distinción básica entre potenciadores y promotores es operativa. Una región potenciadora, en su conjunto, estimula la transcripción a distancia y frecuentemente independiente de la orientación; no es necesario que esto sea cierto para una región promotora o sus elementos componentes. Por otro lado, un promotor
20 tiene uno o más elementos que dirigen el inicio de la síntesis de ARN en un sitio específico y en una orientación particular, mientras que los potenciadores carecen de estas especificidades. Los promotores y potenciadores frecuentemente se superponen y son contiguos, a menudo parecen tener una organización modular muy similar. Un subgrupo de potenciadores son las regiones de control del locus (LCR) que no solo pueden aumentar la actividad transcripcional, sino que también (junto con los elementos aislantes) pueden ayudar a aislar el elemento transcripcional de la secuencias
25 adyacentes cuando se integran en el genoma. Puede usarse cualquier combinación promotora/potenciadora (según la Base de datos de promotores eucariotas EPDB) para impulsar la expresión de los genes, aunque muchos restringirán la expresión a un determinado tipo de tejido o subconjunto de tejidos (revisado en, por ejemplo, Kutzler, M. A. y Weiner, D. B., 2008. Nature Reviews Genetics 9:776-88). Los ejemplos incluyen, aunque no de forma limitativa, potenciadores de la actina humana, miosina, hemoglobina, creatina quinasa muscular, secuencias y de los virus CMV, VSR, y VEB. Se
30 pueden seleccionar potenciadores apropiados para aplicaciones particulares. Las células eucariotas pueden soportar la transcripción citoplásmica de determinados promotores bacterianos si se proporciona la polimerasa bacteriana adecuada, tanto como parte del complejo de administración o como construcción de expresión genética adicional.

35 Señales de poliadenilación

35 Cuando se emplea una inserción de ADNc, se deseará incluir normalmente una señal de poliadenilación para efectuar la poliadenilación adecuada de la transcripción génica. La naturaleza de la señal de poliadenilación no considera importante para tener éxito al llevar a la práctica los presentes métodos, y se emplea cualquiera de dichas secuencias tales como una
40 hormona del crecimiento humano o bovino y las señales de poliadenilación de SV40 y las señales de poliadenilación de LTR. Un ejemplo no limitativo es la señal de poliadenilación de SV40 presente en el plásmido pCEP3 (Invitrogen, Carlsbad, California). Se contempla también que un elemento del casete de expresión sea un terminador. Estos elementos pueden servir para potenciar los niveles de mensaje y para minimizar la lectura a través del casete en otras secuencias. Las secuencias señal de terminación o de poliadenilación (poli A) pueden estar ubicadas, por ejemplo, aproximadamente
45 11-30 nucleótidos posteriores de una secuencia conservada (AAUAAA) en el extremo 3' del ARNm (Montgomery, D.L. y col., 1993. DNA Cell Biol. 12:777-83; Kutzler, M. A., y Weiner, D. B., 2008. Nature Rev. Gen. 9:776-88).

Señales de inicio y sitios de unión al ribosoma interno

50 Se puede requerir también una señal de inicio específica para una traducción eficaz de las secuencias de codificación. Estas señales incluyen el codón de inicio ATG o secuencias adyacentes. Puede ser necesario proporcionar señales exógenas de control de la traducción, que incluyen el codón de inicio ATG. El codón de inicio se coloca en fase con el marco de lectura de la secuencia de codificación deseada para asegurar la traducción de la inserción completa. Las señales exógenas de control de la traducción y los codones de inicio
55 pueden ser tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión se puede potenciar mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción adecuados.

Se puede utilizar el uso de sitios internos de entrada al ribosoma (IRES) para crear multigenes o mensajes policistrónicos. Los elementos IRES pueden evitar el modelo de cribado del ribosoma de la traducción dependiente del extremo metilado en 5' e iniciar la traducción en los sitios internos (Pelletier y Sonenberg, Nature, 334:320-325, 1988). Se han descrito elementos IRES procedentes de dos miembros de la familia del picornavirus (poliomielitis y encefalomiocarditis) (Pelletier y Sonenberg, 1988), así como un IRES de un mensaje de mamífero (Macejak y Sarnow, Nature, 353:90-94, 1991). Los elementos IRES pueden unirse a marcos de lectura abiertos heterólogos. Se pueden transcribir juntos múltiples marcos de lectura abiertos, cada uno de ellos por un IRES, creando mensajes policistrónicos. Dependiendo del elemento IRES, cada marco de lectura abierto es accesible a
65 los ribosomas para una traducción eficaz. Se pueden expresar eficazmente múltiples genes utilizando un único promotor/potenciador para transcribir un único mensaje (véanse las patentes US-5.925.565 y 5.935.819).

Optimización de la secuencia

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

Secuencias líder

Se pueden añadir secuencias líder para mejorar la estabilidad del ARNm y dar como resultado una traducción más eficaz. La secuencia líder por lo general implica dirigir el ARNm hacia el retículo endoplásmico. Los ejemplos incluyen la secuencia señal de la glicoproteína de la envoltura del VIH-1 (Env), que retrasa su propia escisión y la secuencia líder del gen de la IgE (Kutzler, M. A., y Weiner, D. B., 2008. *Nature Rev. Gen.* 9:776-88; Li, V., y col., 2000. *Virology* 272:417-28; Xu, Z. L., y col. 2001. *Gene* 272:149-56; Malin, A. S., y col., 2000. *Microbes Infect.* 2:1677-85; Kutzler, M. A., y col., 2005. *J. Immunol.* 175:112-125; Yang, J.S., y col., 2002. *Emerg. Infect. Dis.* 8:1379-84; Kumar, S., y col., 2006. *DNA Cell Biol.* 25:383-92; Wang, S., y col., 2006. *Vaccine* 24:4531-40). El líder de la IgE se puede usar para potenciar la inserción en el retículo endoplasmático (Tepler, I, y col. (1989) *J. Biol. Chem.* 264:5912).

La expresión de los transgenes puede optimizarse y/o controlarse mediante la selección de métodos apropiados para optimizar la expresión. Estos métodos incluyen, por ejemplo, optimizar los promotores, métodos de administración y secuencias génicas, (por ejemplo, como se presenta en Laddy, D. J. y col., 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 utiliza en la presente memoria se refiere generalmente a una molécula (de 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 púrica o pirimidínica de origen natural que se encuentra en el ADN (p. ej., una adenina “A”, una guanina “G”, una timina “T” o una citosina “C”) o de ARN (p. ej., una A, una G, un uracilo “U” o una C). El término “ácido nucleico” abarca los términos “oligonucleótido” y “polinucleótido”, cada uno como un subgénero del término “ácido nucleico”. Los ácidos nucleicos pueden tener, tener al menos, tener como máximo o incluir 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 del anterior, de longitud.

Los ácidos nucleicos proporcionados en la presente invención pueden tener regiones de identidad o complementariedad con otro ácido nucleico. Se contempla que la región de complementariedad o identidad puede tener al menos 5 restos contiguos, aunque se contempla de forma específica que la región tenga, tenga al menos, tenga como máximo o incluir 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 utiliza en la presente memoria, se entiende que “hibridación”, “se hibrida” o “que se puede hibridar” es la formación de una molécula de dos o tres cadenas o una molécula de tipo bicatenario o tricatenario parcial. El término “templar”, como se utiliza en el presente documento, es un sinónimo del término “hibridar”. El término

“hibridación”, “hibrida(s)” o “que se puede hibridar” abarca las expresiones “condición(ones) rigurosa(s)” o “rigurosidad alta” y las expresiones “rigor bajo” o “condición(ones) de rigor bajo”.

Como se utiliza en la presente memoria, “condición(ones) rigurosa(s)” o “rigor alto” son aquellas condiciones que permiten la hibridación entre o dentro de una o más hebra(s) de ácido nucleico que contienen secuencias(s) complementarias, pero imposibilitan la hibridación de secuencias aleatorias. Las condiciones rigurosas toleran pocos, de tolerar algunos, emparejamientos incorrectos entre un ácido nucleico y una hebra diana. Dichas condiciones son conocidas, y frecuentemente se utilizan en aplicaciones que requieren alta selectividad. Las aplicaciones no limitativas incluyen aislar 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 concentración de sal y/o alta temperatura, tales como las que se proporcionan mediante 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 un rigor deseado se determinan en parte por la longitud del uno o varios ácidos nucleicos en particular, la longitud y el contenido de nucleobases de la(s) secuencia(s) diana, la composición de carga del uno o varios ácidos nucleicos, y la presencia o concentración de formamida, cloruro de tetrametilamonio u otro disolvente o disolventes en una mezcla de hibridación.

Se entiende que estos intervalos, composiciones y condiciones de hibridación se mencionan como ejemplos no limitativos, y que el rigor deseado para una reacción de hibridación particular frecuentemente se determina empíricamente por comparación con uno o más controles positivos o negativos. Dependiendo de la aplicación prevista, se pueden emplear diversas condiciones de hibridación para lograr grados variables de selectividad de un ácido nucleico frente a una secuencia diana. En un ejemplo no limitativo, la identificación o aislamiento de un ácido nucleico diana relacionado que no se hibrida con un ácido nucleico en condiciones rigurosas puede lograrse por hibridación a baja temperatura y/o elevada fuerza iónica. Estas condiciones se denominan de “bajo rigor” o “condiciones de rigor bajo”, y los ejemplos no limitativos de bajo rigor incluyen la hibridación realizada con NaCl de aproximadamente 0,15 M a aproximadamente 0,9 M en un intervalo de temperatura de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 50 °C. Las condiciones de rigor bajo o alto pueden modificarse aún más para adaptarse a una aplicación particular.

30 Modificación de ácido nucleico

Cualquiera de las modificaciones analizadas a continuación se puede aplicar 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 las mismas. Puede modificarse cualquier número adecuado de enlaces en la cadena principal, azúcares y/o bases en un ácido nucleico (por ejemplo, independientemente aproximadamente 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, hasta 100 %). Un nucleósido no modificado es una cualquiera de las bases adenina, citosina, guanina, timina o uracilo unido al átomo de carbono 1' de la beta-D-ribofuranosa.

Una base modificada es una base nucleotídica distinta de adenina, guanina, citosina y uracilo en una posición 1'. Los ejemplos no limitativos de bases modificadas incluyen inosina, purina, piridin-4-ona, piridin-2-ona, fenilo, pseudouracilo, 2,4,6-trimetoxibenceno, 3-metiluracilo, dihidrouridina, naftilo, aminofenilo, 5-alquilcitolinas (p. ej., 5-metilcitolina), 5-alquiluridinas (p. ej., ribotimidina), 5-halouridina (p. ej., 5-bromouridina) o 6-azapirimidinas o 6-alquilpirimidinas (p. ej. 6-metiluridina), propino y similares. Otros ejemplos no limitativos de bases modificadas incluyen nitropirrolilo (p. ej., 3-nitropirrolilo), nitroindolilo (p. ej., 4-nitroindolilo, 5-nitroindolilo, 6-nitroindolilo), hipoxantinilo, isoinosinilo, 2-aza-inosinilo, 7-deaza-inosinilo, nitroimidazolilo, nitropirazolilo, nitrobencimidazolilo, nitroindazolilo, aminoindolilo, pirrolopirimidinilo, difluorotolilo, 4-fluoro-6-metilbencimidazol, 4-metilbencimidazol, 3-metil isocarboestirililo, 5-metil iscarbostirililo, 3-metil-7-propinilo iscarbostirililo, 7-azaindolilo, 6-metil-7-azaindolilo, imidzopiridinilo, 9-metil-imidzopiridinilo, pirrolopirizinilo, iscarbostirililo, 7-propinilo iscarbostirililo, propinilo-7-azaindolilo, 2,4,5-trimetilfenilo, 4-metilindolilo, 4,6-dimetilindolilo, fenilo, naftalenilo, antraceno, fenantraceno, pirenilo, estilbenilo, tetraceno, pentaceno y similares.

Por ejemplo, un ácido nucleico puede comprender moléculas de ácido nucleico modificado, con modificaciones en la cadena principal del fosfato. Los ejemplos no limitativos de modificaciones en la cadena principal incluyen fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, fosfotriéster, morfolino, amidato carbamato, carboximetilo, acetamidato, poliamida, sulfonato, sulfonamida, sulfamato, formacetal, tioformacetal y/o modificaciones con alquilsililo. En algunos casos, un resto de azúcar ribosa presente de forma natural en un nucleósido se sustituye por un azúcar hexosa, anillo de heteroalquilo policíclico, o grupo ciclohexenilo. En algunos casos, el azúcar hexosa es una alosa, altrosa, glucosa, manosa, gulosa, idosa, galactosa, talosa, o un derivado de las mismas. La hexosa puede ser una D-hexosa, glucosa o manosa. En algunos casos, el grupo heteroalquilo policíclico puede ser un anillo bicíclico que contiene un átomo de oxígeno en el anillo. En algunos 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.

Los nucleobases de nitropirrolilo y nitroindolilo son miembros de una clase de compuestos conocidos como bases universales. Las bases universales son aquellos compuestos que pueden sustituir a cualquiera de las cuatro bases naturales sin alterar sustancialmente el comportamiento de fusión o la actividad del duplete de oligonucleótido. A diferencia de las interacciones estabilizantes de los enlaces de hidrógeno asociadas con las nucleobases de origen natural, los dupletes de oligonucleótidos que contienen nucleobases de 3-nitropirrolilo solo pueden estabilizarse mediante

interacciones de apilamiento. La ausencia de interacciones por enlace de hidrógeno significativas con nucleobases de nitropirrolilo evita la especificidad de una base complementaria específica. Además, 4-nitroindolilo, 5-nitroindolilo y 6-nitroindolilo presentan muy poca especificidad por las cuatro bases naturales. Los procedimientos para la preparación de 1-(2'-O-metil-.beta.-D-ribofuranosil)-5-nitroindol se analizan en Gaubert, G.; Wengel, J. *Tetrahedron Letters* 2004, 45, 5629.

5 Otras bases universales incluyen hipoxinilo, isoinosinilo, 2 aza-inosinilo, 7-deaza-osinilo, nitroimidazolilo, nitropirazolilo, nitrobencimidazolilo, nitroindazolilo, aminoindolilo, pirrolopirimidinilo y derivados estructurales de los mismos.

El difluorotolilo es una nucleobase no natural que funciona como una base universal. El difluorotolilo es un isómero de la nucleobase natural timina. Pero a diferencia de la timina, el difluorotolilo no presenta una selectividad apreciable por ninguna 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-propinilo son bases universales que producen solo una ligera desestabilización de los dupletes de oligonucleótidos en comparación con la secuencia de oligonucleótidos que contiene solo bases naturales. Otras nucleobases no naturales incluyen 7-azaindolilo, 6-metil-7-azaindolilo, imidizopiridinilo, 9-metil-imidizopiridinilo, pirrolopirizinilo, isocarboestirililo, 7-propinil isocarboestirililo, propinil-7-azaindolilo, 2,4,5-trimetilfenilo, 4-metilindolilo, 4,6-dimetilindolilo, fenilo, naftalenilo, antraceno, fenantraceno, pirenilo, estilbenilo, tetraceno, pentaceno, y derivados estructurales de los mismos. Para una discusión más detallada, incluidos los procedimientos sintéticos, de difluorotolilo, 4-fluoro-6-metilbencimidazol, 4-metilbencimidazol y otras bases no naturales mencionadas anteriormente, véase: Schweitzer y col., *J. Org. Chem.*, 59:7238-7242 (1994);

Además, se pueden usar sustituyentes químicos, por ejemplo, agentes de reticulación, para agregar más estabilidad o irreversibilidad a la reacción. Los ejemplos no limitativos de agentes de reticulación incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2 feniletano, glutaraldehído, ésteres de n-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con el ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluidos los ésteres de celulosa disuccinimidilo tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), maleimidias 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. Ciertas composiciones se pueden utilizar para esencialmente "anclar" o "bloquear" un ácido nucleico endógeno a una estructura en particular. Las secuencias de anclaje sirven para evitar la disociación de un ácido nucleico complejo y, por tanto no solamente pueden evitar las copias, sino que también pueden facilitar el marcado, la modificación y/o la clonación de la secuencia endógena. La estructura bloqueada puede regular la expresión génica (es decir inhibir o aumentar la transcripción o replicación) o puede usarse como una estructura estable que después se puede usar para marcar o modificar de cualquier otra forma la secuencia de ácido nucleico endógena, o puede usarse para aislar la secuencia endógena, es decir, para la clonación.

Las moléculas de ácido nucleico no tienen que limitarse a aquellas moléculas que contienen solamente ARN o ADN, sino que abarcan además nucleótidos y no nucleótidos modificados químicamente. El porcentaje de no nucleótidos o nucleótidos modificados puede ser de 1 % a 100 % (p. ej., aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95 %).

Preparación de ácidos nucleicos

Se puede proporcionar un ácido nucleico para usar como control o patrón en un ensayo, o como sustancia terapéutica, por ejemplo. Un ácido nucleico se puede fabricar por cualquier técnica conocida en la materia, tales como, por ejemplo, síntesis química, producción enzimática o producción biológica. Los ácidos nucleicos pueden recuperarse o aislarse 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 una muestra biológica se puede tratar de forma que se potencie la recuperación de moléculas de ácido nucleico pequeñas. Generalmente, los métodos pueden incluir lisis de células con una solución que tiene guanidinio y un detergente.

La síntesis de ácidos nucleicos también se puede realizar según métodos estandarizados. Los ejemplos no limitativos de un ácido nucleico sintético (por ejemplo, un oligonucleótido sintético) incluyen un ácido nucleico preparado por síntesis química in vitro usando química de fosfotriéster, fosfito o fosforamidita y técnicas en fase sólida o por técnicas de desoxirribonucleósido H-fosfonato. Se han descrito en otra parte varios mecanismos diferentes de síntesis de oligonucleótidos.

Los ácidos nucleicos pueden aislarse utilizando técnicas conocidas. Se pueden emplear 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 la proteína o de otros ácidos nucleicos. Dichos métodos pueden involucrar electroforesis con una matriz de gel, columnas de filtración, precipitación con alcohol y/u otro tipo de cromatografía. Si se va a usar o evaluar un ácido nucleico procedente de células, los métodos implican generalmente lisis de las células con un caótopo (p. ej., isotiocianato de guanidinio) y/o detergente (por ejemplo, N-lauroilsarcosina) antes de implementar procesos para aislar poblaciones particulares de ARN.

Los métodos pueden incluir el uso de disolventes orgánicos y/o alcohol para aislar ácidos nucleicos. La cantidad de alcohol añadido a un lisado celular puede alcanzar una concentración de alcohol de aproximadamente 55 % a

60 %. Aunque se pueden emplear 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 tales procedimientos de aislamiento.

- 5 Un proceso de aislamiento de ácido nucleico puede incluir, a veces: a) lisar las células de la muestra con una solución de lisis 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 de alcohol para formar una mezcla de lisado/alcohol, en donde la concentración de alcohol en la mezcla es de aproximadamente 35 % a aproximadamente 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 se puede secar y resuspender en un líquido y volumen apropiado para la manipulación posterior.

15 Métodos de transferencia génica

Para mediar en el efecto de la expresión del transgén en una célula, se deberá transferir las construcciones de expresión a una célula. Dicha transferencia puede emplear métodos víricos o no víricos de transferencia génica. Esta sección proporciona una descripción de los métodos y composiciones para transferencia génica.

- 20 Una célula transformada que comprende un vector de expresión se genera introduciendo el vector de expresión en la célula. Los métodos adecuados para administrar polinucleótidos para la transformación de un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo para usar con los métodos actuales incluyen prácticamente cualquier método mediante el cual un polinucleótido (por ejemplo, ADN) se puede introducir en un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo.

- 25 Una célula hospedadora puede usarse, y se ha usado, como receptora de vectores. Las células hospedadoras pueden derivarse de procariontes o eucariotas, dependiendo de si el resultado deseado es la replicación del vector o la expresión de parte o de todas las secuencias de polinucleótidos codificadas por el vector. Numerosas líneas celulares y cultivos se encuentran disponibles para usar como célula hospedadora, y se pueden obtener a través de la American Type Culture Collection (ATCC), que es una organización que sirve como archivo de cultivos vivos y materiales genéticos.

- 30 Puede determinarse un hospedador adecuado. Generalmente, esto se basa en la cadena principal del vector y el resultado deseado. Por ejemplo, un plásmido o un cósmido se puede introducir en una célula hospedadora procarionte para la replicación de muchos vectores. Las células bacterianas usadas como células hospedadoras para la replicación y/o expresión de vectores incluyen las DH5alpha, JM109 y KC8, así como numerosas bacterias hospedadoras comerciales tales como las bacterias competentes SURE® y las células SOLOPACK Gold Cells (STRATAGENE®, La Jolla, CA). Como alternativa, podrían usarse células bacterianas tales como E. coli LE392 como células hospedadoras de fagovirus. Las células eucariotas que se pueden usar como células hospedadoras incluyen, aunque no de forma limitativa, levaduras, células de insecto y células de mamíferos. Los ejemplos de células hospedadoras eucariotas de mamífero para replicación y/o expresión de un vector incluyen, aunque no de forma limitativa, HeLa, NIH3T3, Jurkat, 293, COS, CHO, Saos y PC12. Los ejemplos de cepas de levadura incluyen, aunque no de forma limitativa, YPH499, YPH500 e YPH501.

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

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

Se puede usar cualquier método apropiado para transfectar o transformar las células, o para administrar las secuencias de nucleótidos o las composiciones de los presentes métodos. Algunos ejemplos se muestran en la presente memoria e incluyen, además, métodos tales como administración mediante polímeros catiónicos, moléculas análogas a lípidos y ciertos productos comerciales, tales como, por ejemplo, IN-VIVO-JET PEI.

Transformación ex vivo

- 55 Varios métodos están disponibles para transfectar células vasculares y tejidos extraídos de un organismo en una configuración ex vivo. Por ejemplo, se han alterado genéticamente células endoteliales caninas mediante transferencia del gen retrovírico in vitro y trasplantado a un can (Wilson y col., Science, 244:1344-1346, 1989). En otro ejemplo, se transfectaron células endoteliales de minicerdo Yucatan mediante retrovirus in vitro y se trasplantaron en una arteria usando un catéter de doble globo (Nabel y col., Science, 244 (4910):1342-1344, 1989). Por lo tanto, se contempla que las células o tejidos se puedan extraer y transfectar ex vivo con los polinucleótidos presentados en la presente memoria. En aspectos particulares, las células o tejidos trasplantados pueden introducirse en un organismo.

Inyección

- 65 Una célula presentadora de antígenos o vector vírico se puede administrar a un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo a través de una o más inyecciones (es decir, una inyección con aguja), tal como, por ejemplo, inyección

subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, intraprostática, intratumoral, intraperitoneal, etc. Los métodos de inyección incluyen, por ejemplo, una composición que comprende una solución salina. Otros aspectos incluyen la introducción de un polinucleótido por microinyección directa. La cantidad del vector de expresión utilizado puede variar dependiendo de la naturaleza del antígeno así como del orgánulo, célula, tejido o el organismo utilizado.

Las inyecciones intradérmicas, intraganglionares o intralinfáticas son algunos de los métodos de administración DC más comúnmente utilizados. La inyección intradérmica se caracteriza por una baja velocidad de absorción en el torrente sanguíneo pero una rápida captación en el sistema linfático. La presencia de grandes cantidades de células dendríticas de Langerhans en la dermis transportarán y procesarán el antígeno intacto hasta los ganglios linfáticos drenantes. La preparación del sitio adecuado es necesaria para realizar esto correctamente (es decir, el cabello se sujeta para observar la colocación correcta de la aguja). La inyección intraganglionar permite la administración directa del antígeno a los tejidos linfáticos. La inyección intralinfática permite la administración directa de las DC.

Electroporación

Un polinucleótido se puede introducir 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 alta tensión. En algunas variantes de este método, se emplean ciertas enzimas degradadoras de la pared celular, tales como enzimas de degradación de pectina, para volver las células receptoras diana más susceptibles a la transformación mediante electroporación que las células sin tratar (patente US-5.384.253).

Transfección de células eucariotas utilizando electroporación ha tenido bastante éxito. Se han transfectado prelinfocitos B de ratones con genes de la inmunoglobulina kappa humana (Potter y col., (1984) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 81, 7161-7165), y se han transfectado hepatocitos de rata con el gen de la cloranfenicol acetiltransferasa (Tur-Kaspa y col., (1986) Mol. Cell Biol., 6, 716-718) de esta forma.

La electroporación *in vivo* para vacunas, o eVac, se ha implementado clínicamente mediante una técnica de inyección simple. Un vector de ADN que codifica un polipéptido se inyecta por vía intradérmica a un paciente. Después, los electrodos aplican pulsos eléctricos al espacio intradérmico, haciendo que las células allí localizadas, especialmente las células dendríticas dérmicas residentes, capturan el vector de ADN y expresen el polipéptido codificado. Después, estas células que expresan polipéptidos activadas mediante inflamación local pueden migrar a los ganglios linfáticos, presentando antígenos, por ejemplo. Un ácido nucleico se administra electroporéticamente cuando se administran usando electroporación, después de, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, la inyección de ácido nucleico o cualquier otro medio de administración por el ácido nucleico se puede administrar a las células por electroporación

Los métodos de electroporación se analizan, por ejemplo en Sardesai, N. Y., y Weiner, D. B., Current Opinion in Immunotherapy 23:421-9 (2011) y Ferraro, B. y col., Human Vaccines 7:120-127 (2011).

Fosfato de calcio

Un polinucleótido se puede introducir en las células con precipitación de fosfato de calcio. Las células KB humanas se transfectaron con ADN de adenovirus 5 (Graham y van der Eb, (1973) Virology, 52, 456-467) con el uso de esta técnica. También de esta manera, el ratón L(A9), el ratón C127, CHO, CV-1, BHK, NIH3T3 y las células HeLa se transfectaron con un gen marcador de neomicina (Chen y Okayama, Mol. Cell Biol., 7(8):2745-2752, 1987), y hepatocitos de rata se transfectaron con una variedad de genes marcadores (Rippe y col., Mol. Cell Biol., 10:689-695, 1990).

DEAE-dextrano

Un polinucleótido se puede administrar a una célula usando dextrano DEAE seguido de polietilenglicol. De esta manera, se introdujeron plásmidos indicadores en mieloma de ratón y células de eritroleucemia (Gopal, T.V., Mol Cell Biol. 1985 Mayo;5(5):1188-90).

Carga por sonicación

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

Transfección mediada por liposomas

En otro aspecto, un polinucleótido puede atraparse en un complejo lipídico tal como, por ejemplo, un liposoma. Los liposomas son estructuras vesiculares caracterizadas por una membrana con una bicapa de fosfolípidos y un medio acuoso interno. Los liposomas multilamelares tienen múltiples capas lipídicas separadas por medio acuoso. Se forman espontáneamente cuando los fosfolípidos se suspenden en un exceso de solución acuosa. Los componentes lipídicos experimentan autorredispersión 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. pp. 87-104). También se contempla un polinucleótido complejado con lipofectamina (Gibco BRL) o Superfect (Qiagen).

Transfección mediada por el receptor

Adicionalmente, un polinucleótido puede administrarse a una célula diana mediante vehículos de administración mediados por el receptor. Estas aprovechan la captación selectiva de macromoléculas mediante endocitosis mediada por el receptor que se producirá en una célula diana. En vista de la distribución específica del tipo celular de diversos receptores, este método de administración añade otro grado de especificidad.

Ciertos vehículos de direccionamiento génico mediados por receptores comprenden un ligando específico del receptor celular y un agente de unión al polinucleótido. Otros comprenden un ligando específico del 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 receptores (Wu y Wu, (1987) J. Biol. Chem., 262, 4429-4432; Wagner y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87(9):3410-3414, 1990; Perales y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:4086-4090, 1994; Miers, EPO 0273085), que establece la operabilidad de la técnica. Se ha descrito la administración específica en el contexto de otro tipo de célula de mamífero (Wu y Wu, Adv. Drug Delivery Rev., 12:159-167, 1993). En ciertos aspectos, se selecciona un ligando que corresponda a un receptor específicamente expresado en la población de células diana.

Un componente de un vehículo de administración de polinucleótidos de un vehículo dirigido a un polinucleótido específico de célula puede comprender un ligando de unión específico en combinación con un liposoma. El polinucleótido o polinucleótidos que se van a administrar se alojan dentro del liposoma y el ligando de unión específico se incorpora funcionalmente a la membrana del liposoma. Por lo tanto, el liposoma se unirá específicamente a uno o más receptores de una célula diana y administrará el contenido a una célula. Se ha comprobado que estos sistemas son funcionales utilizando sistemas en los que, por ejemplo, se usa el factor de crecimiento epidérmico (EGF) en la administración mediada por receptor de un polinucleótido a las células que presentan una regulación en exceso del receptor de EGF.

Además, el componente del vehículo de administración de polinucleótidos de un vehículo de administración dirigida puede ser el mismo liposoma que puede comprender, por ejemplo, uno o más lípidos o glicoproteínas que dirigen la unión específica a las células. Por ejemplo, se ha incorporado a liposomas la lactosil ceramida, un asiogangliósido terminado en galactosa, y se ha observado un aumento en la captación del gen de la insulina en hepatocitos (Nicolau y col., (1987) Methods Enzymol., 149, 157-176). Se contempla que las construcciones transformantes específicas de tejidos se pueden administrar específicamente a una célula diana de una manera similar.

Bombardeo de microproyectiles

Se pueden usar técnicas de bombardeo de microproyectiles para introducir un polinucleótido en al menos un orgánulo, célula, tejido u organismo (patente US-5.550.318; patente US-5.538.880; patente US-5.610.042; y solicitud PCT WO 94/09699). Este método depende de la capacidad de acelerar los microproyectiles revestidos con ADN a una alta velocidad que les permita atravesar membranas celulares y penetrar en las células sin destruirlas (Klein y col., (1987) Nature, 327, 70-73). Existe una amplia variedad de técnicas de bombardeo de microproyectiles conocidas en la materia, muchas de los cuales son aplicables a los presentes métodos.

En este bombardeo de microproyectiles, una o más partículas pueden revestirse con al menos un polinucleótido y administrarse a células mediante una fuerza propulsora. Se han desarrollado diversos dispositivos para acelerar partículas pequeñas. Uno de estos dispositivos depende de una descarga de alta tensión para generar una corriente eléctrica, que a su vez proporciona la fuerza motriz (Yang y col., (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 tungsteno o oro. Las partículas ilustrativas incluyen las que comprenden tungsteno, platino y, en algunos ejemplos, oro, incluidas, por ejemplo, nanopartículas. Se contempla que, en algunos casos, la precipitación de ADN sobre partículas metálicas no sería necesaria para la administración del ADN a una célula receptora usando el bombardeo de microproyectiles. Sin embargo, se contempla que las partículas puedan contener ADN en lugar de estar revestidas con ADN. Las partículas revestidas con ADN pueden aumentar el nivel de administración del ADN mediante el bombardeo de partículas pero no son, en sí mismas, necesarias.

Ejemplos de métodos de transferencia mediados por vectores víricos

En los métodos presentes se pueden emplear cualquier vector vírico adecuado para administrar secuencias de nucleótidos, o composiciones que comprenden secuencias de nucleótidos, a una célula o a un sujeto, de forma que la célula o células del sujeto puedan expresar los genes codificados por las secuencias de nucleótidos. Se puede incorporar un transgén a una partícula vírica para mediar la transferencia de genes a una célula. Típicamente, el virus simplemente se expondrá a la célula hospedadora adecuada en condiciones fisiológicas, lo que permite la captación del virus. Los presentes métodos se emplean de forma ventajosa usando una variedad de vectores víricos, como se analiza más adelante.

Adenovirus

Un adenovirus es especialmente adecuado para usar como vector de transferencia génica debido a su genoma de ADN de tamaño medio, facilidad de manipulación, alto título, amplia gama de células diana y alta capacidad de infección. El genoma vírico de aproximadamente 36 kb se une por repeticiones terminales invertidas (ITR) de 100-200 pares de bases (pb), en las que están contenidos elementos que actúan en cis necesarios para la replicación y el empaquetamiento del ADN vírico. Las regiones inicial (E) y posterior (L) del genoma que contienen diferentes unidades de transcripción se dividen al inicio de replicación del ADN vírico.

La región E1 (E1A y E1B) codifica las proteínas responsables de la regulación de la transcripción del genoma vírico y unos pocos genes celulares. La expresión de la región E2 (E2A y E2B) da como resultado la síntesis de proteínas para la replicación del ADN vírico. Estas proteínas están involucradas en la replicación de ADN, la expresión de genes tardíos y la desactivación 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), incluidas la mayoría de las proteínas de la cápside vírica, se expresan solamente después de un procesamiento significativo de un único transcrito primario obtenido por el promotor tardío principal (MLP). El MLP (localizado a 16,8 unidades cartográficas) es particularmente eficaz durante la fase final de la infección, y todos los ARNm caracterizados a partir de este promotor poseen una secuencia líder 5' tripartita (TL), que los convierte en útiles para la traducción.

Para optimizar el adenovirus para la terapia génica, es necesario maximizar la capacidad de transporte de manera que se puedan incluir grandes segmentos de ADN. También es muy deseable reducir la toxicidad y la reacción inmunitaria asociadas con determinados productos adenovíricos. Las dos metas son, en cierta medida, colindantes ya que la eliminación de los genes adenovíricos sirve para ambos fines. Mediante la práctica de los presentes métodos, es posible conseguir ambas metas reteniendo a la vez la capacidad de manipular las construcciones terapéuticas con relativa facilidad.

El gran desplazamiento de ADN es posible porque todos los elementos en cis necesario para la replicación del ADN vírico se encuentran en las repeticiones terminales invertidas (ITR) (100-200 pb) en cualquier extremo del genoma vírico lineal. Los plásmidos que contienen las ITR puede replicarse en presencia de un adenovirus no defectuoso (Hay, R. T., y col., *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 empaquetamiento para la encapsulación vírica se localiza entre los pb 194-385 (0,5-1,1 unidades cartográficas) en el extremo izquierdo del genoma vírico (Hearing y col., J. (1987) *Virol.*, 67:2555-2558). Esta señal imita el sitio de reconocimiento de proteínas en el ADN del bacteriófago lambda donde una secuencia específica cerca del extremo izquierdo, pero fuera de la secuencia del extremo cohesivo, media la unión a las proteínas necesarias para la inserción del ADN en la estructura de la cabeza. Los vectores de sustitución E1 de Ad han demostrado que un fragmento de 450 pb (0-25 unidades cartográficas) en el extremo izquierdo del genoma vírico podría dirigir el empaquetamiento en células 293 (Levrero y col., *Gene*, 101:195-202, 1991).

Anteriormente, se ha comprobado que determinadas regiones del genoma adenovírico se pueden incorporar en el genoma de células de mamíferos y los genes codificados expresarse a partir del anterior. Estas líneas celulares pueden soportar la replicación de un vector adenovírico que es deficiente en la función adenovírica codificada por la línea celular. También se han producido informes de complementación de vectores adenovíricos con deficiencias en la replicación mediante vectores "auxiliares", p. ej., virus naturales o mutantes defectivos condicionalmente.

Los vectores adenovíricos con defectos de replicación se pueden complementar, en trans, por virus auxiliares. Esta observación sola no permite el aislamiento de vectores de replicación deficiente, sin embargo, por la presencia del virus auxiliar, necesario para proporcionar funciones de replicación, se contaminaría cualquier preparación. Por lo tanto, ha sido necesario un elemento adicional que podría añadir especificidad a la replicación y/o empaquetamiento del vector deficiente en la replicación. Ese elemento se deriva de la función de empaquetamiento del adenovirus.

Se ha comprobado que existe una señal de empaquetamiento para el adenovirus en el extremo izquierdo del mapa de adenovirus convencional (Tibbetts y col. (1977) *Cell*, 12, 243-249). Estudios posteriores han mostrado que un mutante con una delección en la región E1A (194-358 pb) del genoma crecen mal incluso en una línea celular que ha complementado la función inicial (E1A) (Hearing y Shenk, (1983) *J. mol. Biol.* 167, 809-822). Cuando se recombinó un ADN adenovírico de compensación (0-353 pb) en el extremo derecho del mutante, el virus se empaquetó normalmente. Otro análisis de mutación identificó un elemento dependiente de posición corto repetido en el extremo izquierdo del genoma de Ad5. Se ha descubierto que una copia de la repetición era suficiente para un empaquetado eficaz si está presente en cualquier extremo del genoma, pero no cuando se mueve hacia el interior de la molécula de ADN de Ad5 (Hearing y col., J. (1987) *virol.*, 67, 2555-2558).

Utilizando versiones mutadas de la señal de empaquetamiento, es posible crear virus auxiliares que se empaquetan con eficacias variables. Típicamente, las mutaciones son mutaciones o delecciones puntuales. Cuando se hacen crecer virus auxiliares con una baja eficacia de empaquetamiento en células auxiliares, el virus se empaqueta, aunque a tasas reducidas en comparación con el virus natural, lo que permite de esta forma la propagación del auxiliar. Cuando estos virus auxiliares se hacen crecer en células junto con el virus que contiene las señales de empaquetamiento naturales,

sin embargo, las señales de empaquetamiento naturales se reconocen preferentemente sobre las versiones mutadas. Proporcionando una cantidad limitante de factor de empaquetamiento, el virus que contiene las señales limitantes se empaqueta selectivamente cuando se compara con los auxiliares. Si la preferencia es suficientemente grande, se pueden conseguir mezclas madre cercanas a la homogeneidad puede conseguirse.

5 Para mejorar el tropismo de las construcciones de ADV por tejidos o especies concretas, las secuencias de fibra de unión al receptor frecuentemente se pueden sustituir entre aislados adenovíricos. Por ejemplo, el ligando del receptor de adenovirus Coxsackie (CAR) descubierto en el adenovirus 5 puede sustituirse por la secuencia de fibra de unión a CD46 del adenovirus 35, consiguiendo un virus con una afinidad de unión muy mejorada por las células hematopoyéticas humanas. El virus "pseudotipado" resultante, el Ad5f35, ha sido la base de varios aislados víricos clínicamente desarrollados. Además, existen varios métodos bioquímicos para modificar la fibra y permitir el redireccionamiento del virus a las células diana. Los métodos incluyen el uso de anticuerpos bifuncionales (con un extremo de unión al ligando CAR y un extremo de unión a la secuencia diana), y biotilación metabólica de la fibra para permitir la asociación con ligandos químicos de tipo avidina personalizados. Alternativamente, se podría unir ligandos (p, ej., anti-CD205 mediante enlazadores heterobifuncionales (p. ej., que contienen PEG), a la partícula adenovírica.

Retrovirus

20 Los retrovirus son un grupo de virus de ARN monocatenarios caracterizados por la capacidad de convertir su ARN en ADN bicatenario en células infectadas mediante un proceso de transcripción inversa (Coffin, (1990) en: *Virology*, ed., Nueva York: Raven Press, pp. 1437-1500). Este ADN resultante se integra a continuación de forma estable en cromosomas celulares como un provirus y dirige la síntesis de las proteínas víricas. La integración da como resultado la retención de las secuencias génicas víricas en la célula receptora y su descendencia. El genoma retrovívico contiene tres genes -gag, pol y env- que codifican las proteínas de la cápsida, la enzima polimerasa, y los componentes de la envoltura, respectivamente. Una secuencia que se encuentra en la dirección 5' del gen gag, denominado psi, funciona como señal para el empaquetamiento del genoma en viriones. Están presentes dos secuencias de repetición terminal larga (LTR) en los extremos 5' y 3' del genoma vírico. Estas contienen secuencias promotoras y potenciadores fuertes y también son necesarias para la integración en el genoma de la célula hospedadora (Coffin, 1990). Así, por ejemplo, la presente tecnología incluye, por ejemplo, células en las cuales el polinucleótido usado para transducir la célula se integra en el genoma de la célula.

35 Para construir un vector retrovívico, se inserta un ácido nucleico que codifica un promotor en el genoma vírico en lugar de determinadas secuencias víricas para producir un virus que tiene defectos de replicación. Para producir viriones, se construye una línea celular de empaquetamiento que contiene los genes gag, pol y env, pero sin los componentes LTR y psi (Mann y col., (1983) *Cell*, 33, 153-159). Cuando un plásmido recombinante que contiene un ADNc humano, junto con las secuencias retrovívicas LTR y psi se introduce en esta línea celular (por precipitación con fosfato de calcio, por ejemplo), la secuencia psi permite que el transcrito de ARN del plásmido recombinante se empaquete en partículas víricas (Nicolas, J. F. y Rubenstein, J. L. R., (1988) en: *Vectors: a Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Rodríguez and Denhardt, Eds.). Nicolás y Rubinstein; Temin y col., (1986) en: *Gene Transfer*, Kucherlapati (ed.), Nueva York: Plenum Press, pp. 149-188; Mann y col., 1983). El medio que contiene los retrovirus recombinantes se recoge, opcionalmente se concentra, y se utiliza para transferencia génica. Los vectores retrovívicos pueden infectar una amplia variedad de tipos celulares. Sin embargo, la integración y expresión estable de muchos tipos de retrovirus requiere la división de células hospedadoras (Paskind y col., (1975) *Virology*, 67, 242-248).

45 Se ha desarrollado recientemente una solución diseñada para el direccionamiento específico de los vectores retrovívicos basada en la modificación química de un retrovirus mediante la adición química de restos de galactosa a la envoltura vírica. Esta modificación podría permitir la infección específica de células tales como hepatocitos mediante los receptores de asialoglicoproteínas, lo que puede ser deseable.

50 Se diseñó un enfoque diferente al direccionamiento de retrovirus recombinantes que utiliza anticuerpos biotilados contra una proteína de la envoltura retrovívica y contra un receptor celular específico. Los anticuerpos se acoplaron mediante los componentes de biotina utilizando estreptavidina (Roux y col., (1989) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 86, 9079-9083). Mediante el uso de anticuerpos contra los antígenos de clase I y clase II del complejo de histocompatibilidad mayor, se ha demostrado la infección de una variedad de células humanas que perforan aquellos antígenos superficiales con un virus ecotrópico in vitro (Roux y col., 1989).

Virus adenoasociados

60 Los VAA utilizan un ADN monocatenario lineal de aproximadamente 4700 pares de bases. Repeticiones terminales invertidas flanquean el genoma. Hay dos genes presentes dentro del genoma, lo que da lugar a numerosos productos génicos distintos. El primero, el gen cap, produce tres proteínas diferentes del virión (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 rep es responsable de transactivar la transcripción del VAA.

65 Los tres promotores del VAA se designan por su localización, en unidades cartográficas, en el genoma. Estos son, de izquierda a derecha, p5, p19 y p40. La transcripción produce seis transcritos, dos iniciados en cada uno de los

tres promotores, donde uno de cada par experimenta corte y empalme. El sitio de corte y empalme, derivado de las unidades cartográficas 42-46, es el mismo para cada transcrito. Las cuatro proteínas no estructurales se derivan aparentemente del más largo de los transcritos, y las tres proteínas del virión proceden del transcrito más pequeño.

5 El VAA no se ha asociado con ninguna patología en seres humanos. De manera interesante, para una replicación eficaz, el VAA requiere funciones "auxiliares" de virus tales como el virus del herpes simple I y II, citomegalovirus y, naturalmente, adenovirus. El auxiliar mejor caracterizado es el adenovirus y se ha mostrado que muchas funciones "iniciales" de este virus ayudan en la replicación del VAA. Se cree que la expresión de bajo nivel de las proteínas rep de VAA contienen la expresión estructural del VAA durante la comprobación, y se cree que la infección del virus auxiliar elimina este bloqueo.

10 Las repeticiones terminales del vector AAV se pueden obtener mediante digestión con endonucleasa de restricción del VAA o un plásmido tal como p201, que contiene un genoma de VAA modificado (Samulski y col., J. Virol., 61:3096-3101 (1987)), o por otros métodos que incluyen, aunque no de forma limitativa, síntesis química o enzimática de las repeticiones terminales en función de la secuencia publicada del VAA. Puede determinarse, por ejemplo, mediante análisis de delección, 15 la secuencia mínima o parte de los ITR de VAA necesarios para su funcionamiento, es decir, integración específica del sitio y estable. También se puede determinar qué modificaciones minoritarias de la secuencia se pueden tolerar manteniendo a la vez la capacidad de las repeticiones terminales de dirigir la integración específica de sitio estable.

20 Los vectores basados en VAA han demostrado ser vehículos seguros y eficaces para la administración del gen in vitro, y estos vectores se encuentran en desarrollo y ensayo en etapas preclínicas y clínicas para una amplia gama de aplicaciones en una potencial terapia génica, tanto ex vivo como in vivo (Carter y Flotte (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci., 770; 79-90; Chattejee, y col., (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci., 770, 79-90; Ferrari y col., (1996) J. Virol., 70, 3227-3234; Fisher y col., (1996) J. Virol., 70, 520-532; Flotte y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 90, 10613-10617, (1993); Goodman y col. (1994), Blood, 84, 1492-1500; Kaplitt y col., (1994) Nat'l Genet., 8, 148-153; Kaplitt, M. G., y col., 25 Ann Thorac Surg. 1996 Dic; 62(6):1669-76; Kessler y col., (1996) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 93, 14082-14087; Koeberl y col., (1997) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 94, 1426-1431; Mizukami y col., (1996) Virology, 217, 124-130).

30 La transferencia y expresión génica eficaz mediada por VAA en el pulmón ha producido ensayos clínicos para el tratamiento de la fibrosis quística (Carter y Flotte, 1995; Flotte y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 90, 10613-10617, (1993)). Análogamente, las perspectivas de tratamiento de la distrofia muscular mediante la administración génica mediada por VAA de la distrofina al músculo esquelético, de la enfermedad de Parkinson mediante la administración del gen de la tirosina hidroxilasa al cerebro, de la hemofilia B mediante la administración del gen del Factor IX al hígado, y potencialmente del infarto de miocardio mediante la administración del gen del factor de crecimiento endotelial vascular al corazón, parecen prometedoras porque la expresión del transgén mediada por 35 VAA en estos órganos ha mostrado recientemente ser muy eficaz (Fisher y col., (1996) J. Virol., 70, 520-532; Flotte y col., 1993; Kaplitt y col., 1994; 1996; Koeberl y col., 1997; McCown y col., (1996) Brain Res. 713, 99-107; Ping y col., (1996) Microcirculation, 3, 225-228; Xiao y col., (1996) J. Virol., 70, 8098-8108).

Otros vectores víricos

40 Otros vectores víricos se emplean como construcciones de expresión en los presentes métodos y composiciones. Se emplean vectores derivados de virus tales como de virus vaccinia (Ridgeway, (1988) en: Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses, pp. 467-492; Baichwal y Sugden, (1986) en, Gene Transfer, pp. 117-148; Coupár y col., Gene, 68:1-10, 1988), virus de la viruela aviar y virus del herpes. Estos virus ofrecen varias 45 características para usar en transferencia génica a varias células de mamíferos.

Una vez que la construcción se ha administrado a la célula, el ácido nucleico que codifica el transgén se posiciona y se expresa en diferentes sitios. El ácido nucleico que codifica el transgén se puede integrar de forma estable en el genoma de la célula. Esta integración está en la localización y orientación análogas mediante recombinación homóloga (sustitución del gen) o se integra en una localización aleatoria no específica (aumento del gen). Más aún, el ácido nucleico se puede 50 mantener de manera estable en la célula como un segmento separado episómico de ADN. Dichos segmentos de ácido nucleico o "episomas" codifican secuencias suficientes para permitir un mantenimiento y replicación independiente o sincronizada con el ciclo de la célula hospedadora. Cómo se administra la construcción de expresión a una célula y donde queda el ácido nucleico en la célula es algo que depende del tipo de construcción de expresión empleado.

Métodos para tratar una enfermedad

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

Las células, tales como, por ejemplo, células precursoras, tales como, por ejemplo, hemocitoblastos, células mesenquimales, citoblastos, citoblastos pluripotentes, y embriocitoblastos pueden usarse para terapia celular. Las células pueden ser de un donante o pueden ser células obtenidas del paciente. Las células pueden usarse, por ejemplo, en regeneración, por ejemplo, para sustituir la función de células enfermas. Las células también se 65 pueden modificar para expresar un gen heterólogo de manera que los agentes biológicos pueden administrarse a microentornos específicos tales como, por ejemplo, médula ósea enferma o depósitos metastásicos. Además, las

células del estroma mesenquimal se han utilizado, por ejemplo, para proporcionar actividad inmunosupresora y se pueden usar en el tratamiento del enfermedad del injerto contra el hospedador y los trastornos autoinmunitarios. Las células proporcionadas en la presente descripción contienen un interruptor de seguridad que puede ser valioso en una situación en la que es necesario eliminar las células. Por ejemplo, cuando se proporcionan células precursoras al paciente, en algunas situaciones puede producirse un evento adverso, tal como la diferenciación incorrecta de la célula a un tipo de célula más madura, o una invitación no deseada en otro tejido, por ejemplo, por lo que es necesario eliminar las células terapéuticas. Por “célula terapéutica” se entiende una célula utilizada en la terapia celular, es decir, una célula administrada a un sujeto para tratar o prevenir una dolencia o enfermedad. En tales casos, cuando las células tienen un efecto negativo, los presentes métodos pueden usarse para eliminar las células terapéuticas a través de la apoptosis parcial.

En otros ejemplos, se usan linfocitos T para tratar diversas enfermedades y dolencias, y como parte del trasplante de citoblastos. Un evento adverso que puede aparecer después del trasplante de linfocitos T haploideños es la enfermedad del injerto contra el hospedador (GvHD). La probabilidad de que aparezca una GvHD aumenta con el número de linfocitos T trasplantados. Esto limita el número de linfocitos T que pueden infundirse. Al tener la capacidad de eliminar selectivamente los linfocitos T infundidos si se produce la GvHD en el paciente, se puede infundir un número mayor de linfocitos T, aumentando la cantidad a más de 10^6 , más de 10^7 , más de 10^8 o más de 10^9 células. La cantidad de linfocitos T/kg de peso corporal que se pueden administrar puede estar comprendida, por ejemplo, de aproximadamente 1×10^4 linfocitos T/kg de peso corporal a aproximadamente 9×10^7 linfocitos T/kg de peso corporal, por ejemplo aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9×10^4 ; aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9×10^5 ; aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9×10^6 ; o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9×10^7 linfocitos T/kg de peso corporal. En otros ejemplos, se pueden usar células terapéuticas que no sean linfocitos T. La cantidad de células terapéuticas/kg de peso corporal que se pueden administrar puede estar comprendida, por ejemplo, de aproximadamente 1×10^4 linfocitos T/kg de peso corporal a aproximadamente 9×10^7 linfocitos T/kg de peso corporal, por ejemplo aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9×10^4 ; aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9×10^5 ; aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9×10^6 ; o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9×10^7 células terapéuticas/kg de peso corporal.

La expresión “dosis unitaria” como se refiere al inóculo se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para mamíferos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de composición farmacéutica calculada para producir el efecto inmunogénico deseado en asociación con el diluyente requerido. Las especificaciones para la dosis unitaria de un inóculo están marcadas y dependen de las características únicas de la composición farmacéutica y del efecto inmunitario en particular que se va a conseguir.

Una cantidad eficaz de la composición farmacéutica, tal como el ligando multimérico que se muestra en a presente memoria, sería la cantidad que consigue este resultado seleccionado de eliminar selectivamente la cantidad o concentración deseada de células que incluyen el vector caspasa-9, tal como más de 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 97 %, o menor de 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 % o 10 % de las células que expresan la caspasa-9 se destruyen. 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 dolencia que se va a tratar, la composición particular que se administra, el tamaño del sujeto y/o la gravedad de la enfermedad o dolencia. Se puede determinar empíricamente la cantidad eficaz de una composición específica presentada en la presente memoria sin requerir una experimentación excesiva.

Los términos “puesta en contacto” y “exposición” cuando se aplica a una célula, tejido u organismo, se utilizan en la presente memoria para describir el proceso mediante el cual la composición farmacéutica y/u otro agente, tal como, por ejemplo, un agente quimioterapéutico o radioterapéutico, se administran a una célula, tejido u organismo diana, o se colocan en yuxtaposición directa con la célula, tejido u organismo diana. Para conseguir la destrucción o estasia celular, la farmacéutica y/o uno o varios agentes adicionales se administran a una o más células en una cantidad combinada eficaz para destruir la(s) célula(s) o evitar su división.

La administración de la composición farmacéutica puede preceder, ser simultánea de y/o seguir el uno o varios agentes adicionales en intervalos comprendidos de minutos a semanas. En aspectos donde la composición farmacéutica y el uno o varios agentes adicionales se aplican por separado a una célula, tejido u organismo, se aseguraría, generalmente, que no expire un periodo de tiempo significativo entre los momentos de cada administración, de forma que la composición farmacéutica y el uno o varios agentes puedan seguir teniendo la capacidad de ejercer un efecto combinado sobre la célula, tejido u organismo. Por ejemplo, en dichos casos, se contempla que se puede poner en contacto la célula, tejido u organismo con dos, tres, cuatro o más realizaciones de forma prácticamente simultánea (es decir, en menos de aproximadamente un minuto) con la composición farmacéutica. En otros aspectos, se pueden administrar uno o más agentes dentro de sustancialmente simultáneamente, de aproximadamente 1 minuto, a aproximadamente 24 horas a aproximadamente 7 días a aproximadamente 1 a aproximadamente 8 semanas o más, y en cualquier intervalo derivable de los anteriores, antes y/o después de administrar el vector de expresión. Además, se pueden emplear varios regímenes combinados de la composición farmacéutica presentada en la presente memoria y uno o más agentes.

Tratamiento terapéutico optimizado y personalizado

La inducción de la apoptosis después administrar el dímero podría optimizarse al determinar la estadio de la enfermedad del injerto contra el hospedador, o el número de células terapéuticas no deseadas que permanecen en el paciente.

5 Por ejemplo, determinar que un paciente tiene GvHD y el estadio del GvHD, proporciona una indicación al especialista que puede ser necesario inducir la apoptosis asociada a la caspasa-9 mediante la administración del ligando multimérico. En otro ejemplo, determinar que un paciente tiene un nivel reducido de GvHD después del tratamiento con el ligando multimérico puede indicar al especialista que no se necesita ninguna dosis adicional del ligando multimérico. Análogamente, después del tratamiento con el ligando multimérico, determinar que el paciente continúa presentando
10 síntomas de GvHD, o tiene una recaída de GvHD, puede indicar al especialista que puede ser necesario administrar al menos una dosis adicional de ligando multimérico. Se pretenden que el término “dosificación” incluya tanto la cantidad de dosis como la frecuencia de administración, tales como, por ejemplo, la temporalización de la siguiente dosis. El término “nivel de dosificación” se refiere a la cantidad del ligando multimérico administrado con respecto al peso corporal del sujeto. Por lo tanto, aumentar el nivel de dosificación significaría aumentar la cantidad del ligando
15 administrado con respecto al peso corporal del sujeto. Además, aumentar la concentración de la dosis administrada, tal como, por ejemplo, cuando el ligando multimérico se administra utilizando una bomba de infusión continua, se refiere a que la concentración administrada (y, por lo tanto, la cantidad administrada) por minuto, o segundo, se aumenta.

Una indicación de ajustar o mantener una dosis de fármaco posterior tal como, por ejemplo, una dosis posterior del ligando multimérico, y/o la dosificación del fármaco posterior, puede proporcionarse de cualquier manera conveniente. Una indicación puede proporcionarse en forma tabular (p. ej., en un medio físico o electrónico). Por ejemplo, los síntomas observados de la enfermedad del injerto contra el hospedador pueden proporcionarse en una tabla, y el
20 especialista puede comparar los síntomas con una lista o tabla de estadios de la enfermedad. El especialista puede después identificar en la tabla una indicación de una dosis de fármaco posterior. La indicación puede presentarse (p. ej., mostrarse) en un ordenador, una vez que los síntomas o el estadio de GvHD se proporcione al ordenador (p. ej., introducido en la memoria del ordenador). Por ejemplo, esta información puede proporcionarse a un ordenador (p. ej., introducida en una memoria de ordenador por un usuario o transmitida a un ordenador mediante un dispositivo remoto en una red informática), y el programa informático del ordenador puede generar una indicación para ajustar o mantener
25 una dosis de fármaco posterior y/o proporcionar la cantidad de dosis de fármaco posterior.

Una vez que se determina una dosis posterior en función de la indicación, el especialista puede administrar la dosis posterior o proporcionar instrucciones para ajustar la dosis a otra persona o entidad. El término “especialista”, como se utiliza en la presente memoria, puede referirse al responsable de tomar decisiones, y un especialista es un profesional sanitario. El responsable de la toma de decisiones puede ser un ordenador o una salida visualizada de
30 un programa informático, y un proveedor de servicios sanitarios puede actuar sobre la indicación o sobre la dosis de fármaco posterior presentada por el ordenador. El responsable de la toma de decisiones puede administrar la dosis posterior directamente (por ejemplo, infundir la dosis posterior al sujeto) o remotamente (por ejemplo, el responsable de la toma de decisiones puede cambiar los parámetros de la bomba de forma remota).

Los métodos descritos en la presente descripción incluyen, aunque no de forma limitativa, la administración de una cantidad eficaz de una célula activada, un ácido nucleico o una construcción de expresión que codifica el anterior. Una “cantidad eficaz” de la composición farmacéutica, por lo general, se define como la cantidad suficiente para conseguir de forma detectable y repetida el resultado deseado mencionado, por ejemplo, mejorar, reducir, minimizar o limitar el alcance de la enfermedad o sus síntomas. Pueden aplicarse otras definiciones más
35 rigurosas, que incluyen la eliminación, erradicación o curación de la enfermedad. Puede existir una etapa de monitorizar los biomarcadores para evaluar la eficacia del tratamiento y controlar la toxicidad.

Formulaciones y rutas para la administración a pacientes

50 Cuando se contemplan aplicaciones clínicas, será necesario preparar composiciones farmacéuticas -construcciones de expresión, vectores de expresión, proteínas fusionadas, células transfectadas o transducidas, en una forma apropiada para la aplicación prevista. Generalmente, esto implica preparar composiciones que estén prácticamente exentas de pirógenos, así como otras impurezas que pudieran ser perjudiciales para seres humanos o animales.

El ligando multimérico tal como, por ejemplo, AP1903, se puede administrar, por ejemplo, en dosis de aproximadamente 0,1 a 10 mg/kg de peso corporal del sujeto, de aproximadamente 0,1 a 5 mg/kg de peso corporal del sujeto, de aproximadamente 0,2 a 4 mg/kg de peso corporal del sujeto, de aproximadamente 0,3 a 3 mg/kg de peso corporal del sujeto, de aproximadamente 0,3 a 2 mg/kg de peso corporal del sujeto, o de aproximadamente 0,3 a 1 mg/kg de peso corporal 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,
60 6, 7, 8, 9 o 10 mg/kg de peso corporal del sujeto. El ligando puede proporcionarse a 0,4 mg/kg por dosis, por ejemplo, a una concentración de 5 mg/ml. Se pueden proporcionar viales u otros recipientes 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.

65 Por lo general, se puede desear emplear sales y tampones adecuados para convertir los vectores de administración en estables y permitir la captación por células diana. También pueden utilizarse tampones cuando las células recombinantes

se introducen en el paciente. Las composiciones acuosas comprenden una cantidad eficaz del vector a células, disuelto o disperso en un portador o medio acuoso farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones se denominan también inóculos. Un portador farmacéuticamente aceptable incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción y similares. Se conoce el uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas. Salvo en la medida que algún medio o agente convencional resulte incompatible con los vectores o células, se contempla su uso en composiciones terapéuticas. En las composiciones también se pueden incorporar ingredientes activos complementarios.

Las composiciones activas pueden incluir preparaciones farmacéuticas clásicas. Administración de estas composiciones será por cualquier ruta habitual siempre que el tejido diana está disponible mediante dicha vía. Esto incluye, por ejemplo, la administración por vía oral, nasal, bucal, rectal, vaginal o tópica. Alternativamente, la administración puede ser por medio de inyección ortotópica, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa. Dichas composiciones normalmente se administrarían como composiciones farmacéuticamente aceptables, que se analizan en la presente memoria.

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 es fluida hasta el punto de que permita la administración fácil con una jeringa. Es estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se conserva contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un medio de disolución o de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. Se puede mantener la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En ciertos ejemplos, pueden incluirse agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasen la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Para la administración oral, las composiciones pueden incorporar excipientes y utilizarse en forma de colutorios y dentífricos no ingeribles. Se puede preparar un colutorio que incorpora el ingrediente activo en la cantidad necesaria en un disolvente adecuado, tal como una solución de borato de sodio (solución de Dobell). Alternativamente, el ingrediente activo puede incorporarse a un enjuague antiséptico que contiene borato de sodio, glicerina y bicarbonato de potasio. El ingrediente activo también puede dispersarse en dentífricos, incluidos, por ejemplo: geles, pastas, polvos y suspensiones acuosas. El ingrediente activo puede añadirse en una cantidad terapéuticamente efectiva a un dentífrico de pasta que puede incluir, por ejemplo, agua, aglutinantes, abrasivos, agentes saborizantes, agentes espumantes y humectantes.

Las composiciones pueden formularse en 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 derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

Después de la formulación, las soluciones se administrarán de manera compatible con la formulación de dosificación y en tal cantidad que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas farmacéuticas tales como soluciones inyectables, cápsulas de liberación de fármacos y similares. Para la administración parenteral en solución acuosa, por ejemplo, la solución puede amortiguarse adecuadamente en caso necesario, y el diluyente líquido debe convertirse en isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, se pueden emplear medios acuosos estériles. Por ejemplo, se podría disolver una dosificación en 1 ml de solución de NaCl isotónica y bien añadirse a 1000 ml de fluido de hipodermocilisis o se inyecta en el sitio propuesto de la infusión (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Se producirá necesariamente alguna variación en la dosificación dependiendo de la dolencia del sujeto que se está tratando. La persona responsable de la administración, en cualquier caso, determinará la dosis adecuada para el sujeto individual. Además, para la administración a seres humanos, las preparaciones deben cumplir los estándares de esterilidad, pirogenicidad y normas generales de seguridad y pureza según lo exigido por la FDA Office of Biologics Standards.

Ejemplos

Los ejemplos que se definen a continuación ilustran ciertos aspectos y no limitan la tecnología.

Los mecanismos para reducir selectivamente las células del donante se han estudiado como interruptores de seguridad para terapias celulares, pero se han producido complicaciones. Se ha obtenido cierta experiencia con genes interruptores de seguridad para los linfocitos T, ya que la inmunoterapia con este tipo de células a

mostrado ser eficaz para el tratamiento de infecciones víricas y neoplasias (Walter, E.A., y col., *N. Engl. J. Med.* 1995, 333:1038-44; Rooney, C. M., y col., *Blood.* 1998, 92:1549-55; Dudley, M.E., y col., *Science* 2002, 298:850-54; Marjit, W.A., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100:2742-47). La timidina quinasa derivada del virus del herpes simple I (HSVTK) se ha usado como interruptor suicida in vivo en infusiones de linfocitos T de donante para el tratamiento de la neoplasia recurrente, y el virus de Epstein-Barr (VEB) en la linfoproliferación después del trasplante de hemocitoblastos (Bonini C, y col., *Science.* 1997, 276:1719-1724; Tiberghien P, et al., *Blood.* 2001, 97:63-72). Sin embargo, la destrucción de los linfocitos T que producen la enfermedad del injerto contra el hospedador fue incompleta, y el uso de ganciclovir (o análogos) como profármaco para activar el VHS-TK impide la administración de ganciclovir como fármaco antivírico para infecciones de citomegalovirus. Este mecanismo de acción también requiere interferencia con la síntesis de ADN, dependiente de la división celular, de forma que la destrucción celular puede prolongarse durante varios días y ser incompleta, produciendo un retraso prolongado en el beneficio clínico (Ciceri, F. y col., *Lancet Oncol.* 2009, 262:1019-24). Además, las respuestas inmunitarias dirigidas por el VHS-TK han dado como resultado la eliminación de las células transducidas con VHS-TK, incluso en pacientes con inmunosupresión por el virus de la inmunodeficiencia humana estimulados por inmunodeficiencia humana y con trasplante de médula ósea, lo que compromete la persistencia y, por lo tanto, la eficacia de los linfocitos T infundidos. VHS-TK también procede de virus y es, por lo tanto, potencialmente inmunógeno (Bonini C, y col., *Science.* 1997, 276:1719-1724; Riddell S R, y col., *Nat Med.* 1996, 2:216-23). El gen de la citosina desaminasa derivado de *E coli* derivada también se ha usado clínicamente (Freytag S O, y col., *Cancer Res.* 2002, 62:4968-4976), pero como xenoantígeno, puede ser inmunógeno y, por lo tanto, incompatible con terapias basadas en linfocitos T que requieran persistencia a largo plazo. El CD20 transgénico humano, que se puede activar mediante un anticuerpo dirigido contra CD20 monoclonal quimérico, se ha propuesto como un sistema de seguridad no inmunógeno (Introna M, y col., *Hum Gene Ther.* 2000, 11: 611-620).

La siguiente sección proporciona ejemplos de métodos para proporcionar un interruptor de seguridad en células usadas para terapia celular, usando una proteína caspasa-9 quimérica.

Ejemplo 1: Construcción y evaluación de vectores de expresión suicidas de caspasa-9 como interruptor

Construcción de vectores y confirmación de la expresión

En la presente memoria se presenta un interruptor de seguridad que puede expresarse de manera estable y eficaz en linfocitos T humanos. El sistema incluye productos génicos humanos con bajo potencial inmunógeno que se han modificado para interactuar con un fármaco dimerizador de molécula pequeña que puede producir la eliminación selectiva de linfocitos T transducidos que expresan el gen modificado. Además, la caspasa-9 inducible mantiene la función en linfocitos T que expresan en exceso las moléculas antiapoptóticas.

Se construyeron vectores de expresión adecuados para usar como agente terapéutico que incluían una actividad de caspasa-9 humana modificada humana fusionada a una proteína de unión a FK506 (FKBP) tal como, por ejemplo, FKBP12v36. La actividad del híbrido de caspasa-9/FK506 se puede dimerizar con un compuesto farmacéutico de molécula pequeña. Las versiones de la longitud completa, troncada y modificada de la actividad de caspasa-9 se fusionaron con el dominio de unión a ligando, o región de multimerización, y se insertaron dentro del vector retroviral MSCV.IRES.GRP, que también permite la expresión del marcador fluorescente, GFP. La Fig. 1A ilustra los vectores de expresión de longitud completa, troncados y modificados, construidos y evaluados como un interruptor suicida 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 (FKBP—por ejemplo, variantes de FKBP12v36) unidas mediante un enlazador Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser a la subunidad grande y pequeña de la molécula de caspasa (véase la Fig. 1A). La caspasa-9 inducible de longitud completa (F'-F-C-Casp9.I.GFP) tiene una caspasa-9 de longitud completa, también incluye un dominio de reclutamiento de caspasa (CARD; GenBank NM001 229) unida a 2 proteínas de unión a FK506 de 12 kD humanas (FKBP12; GenBank AH002 818) que contienen una mutación F36V (Fig. 1A). La secuencia de aminoácidos de una o más de las FKBP (F') tenía codones inestables (por ejemplo, el 3^{er} nucleótido de cada codón de aminoácido se alteró mediante una mutación silenciosa que mantenía el aminoácido originalmente codificado) para evitar la recombinación homóloga cuando se exprese en un retrovirus. F'-F-C-Casp9C3S incluye una mutación de cisteína a serina en la posición 287 que rompe su sitio de activación. En las construcciones F'-F-Casp9, F-C-Casp9 y F'-Casp9, tanto el dominio de activación de la caspasa (CARD), un FKBP, o ambos, estaban eliminados, respectivamente. Todas las construcciones se clonaron en MSCV.IRES.GFP como fragmentos EcoRI-XhoI.

Linfocitos 293T se transfectaron con cada una de estas construcciones y 48 después de la transducción, la expresión del gen marcador GFP se analizó por citometría de flujo. Además, 24 horas después de la transfección, las células 293T se incubaron durante la noche con CID 100 nM y posteriormente se tiñeron con el marcador de apoptosis anexina V. La media y desviación estándar del nivel de expresión del transgén (GFP media) y el número de células apoptóticas antes y después de la exposición al inducción de dimerización químico (CID) (% de anexina V dentro de las células GFP~) de 4 experimentos separados se muestran de la segunda a la quinta columna de la tabla de la Fig. 1A. Además del nivel de expresión de GFP y la tinción de anexina V, los productos génicos expresados de caspasa-9 de longitud completa, troncada y modificada también se analizaron por

transferencia Western para confirmar que los genes de caspasa-9 se habían expresado y que el producto expresado tenía el tamaño esperado. Los resultados de la transferencia Western se presentan en la Fig. 1B.

5 La expresión simultánea de las construcciones de caspasa-9 inducible del tamaño esperado con el gen marcador GFP en las células 293T transfectadas se demostró mediante transferencia Western con un anticuerpo caspasa-9 específico de los restos de aminoácidos 299-318, presentes en las moléculas de caspasa tanto de longitud completa como truncadas, así como un anticuerpo específico de GFP. Las transferencias Western se realizaron como se muestra en la presente memoria.

10 Las células 293T transfectadas se resuspendieron en tampón de lisis (Tris al 50 % en Gly, dodecilsulfato sódico [SDS] al 10 %, beta-mercaptoetanol al 4 %, glicerol al 10 %, agua al 12 %, azul de bromofenol del 4 % al 0,5 %) que contenía aprotinina, leupeptina, y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (Boehringer Ingelheim, Alemania) y se incubaron durante 30 minutos en hielo. Después de una centrifugación de 30 minutos, se recogió el sobrenadante, se mezcló
15 1:2 con tampón Laemmli (Bio Rad, Hercules, CA), se llevó a ebullición y se cargó en un gel de poliacrilamina SDS al 10 %. La membrana se sondeó con una inmunoglobulina G de conejo contra caspasa-9 (restos de aminoácidos 299-3 18) (IgG; Affinity BioReagents, Golden, CO; dilución 1:500) y con IgG de ratón contra GFP (Covance, Berkeley, CA; dilución 1:25.000). Después, las transferencias se expusieron a anticuerpos secundarios acoplados con peroxidasa adecuados y la expresión de proteínas se detectó con quimioluminiscencia mejorada (ECL; Amersham, Arlington Heights, IL). A continuación, se purgó la membrana y se volvió a sondear con anticuerpo policlonal de
20 cabra contra actina (Santa Cruz Biotechnology; dilución 1:500) para verificar la igualdad de carga.

Las bandas de tamaño más pequeño adicionales, observadas en la Fig. 1B, probablemente representen productos de degradación. Es posible que los productos de degradación de las construcciones F'F-C-Casp9 y F'F-Casp9 no se detecten debido a un menor nivel de expresión de estas construcciones como resultado de su
25 actividad basal. La carga igual de cada muestra se confirmó por las cantidades sustancialmente iguales de actina mostradas en la parte inferior de cada hilera de la transferencia Western, lo que indica que cantidades sustancialmente similares de proteína se cargaron en cada hilera.

30 Evaluación de las construcciones de expresión del interruptor suicida de caspasa-9.

Líneas celulares

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

Transducción del retrovirus

45 Para la producción transitoria de retrovirus, los linfocitos 293T se transfectaron con construcciones de iCasp9/iFas, junto con plásmidos que codifican gag-pol y RD 114 de la envoltura usando el reactivo de transfección GeneJuice (Novagen, Madison, WI). Los virus se recogieron de 48 a 72 horas después de la transfección, se sometieron a congelación ultrarrápida y se almacenaron a ~ 80 °C hasta su uso. Una línea productora de retrovirus derivada de FLYRD 18 se generó mediante transducciones múltiples con un sobrenadante retrovítico pseudotipado VSV-G transitorio. Las células FLYRD18
50 con la mayor expresión del transgén se clasificaron como células individuales, y el clon que produjo el título vírico más alto se expandió y se utilizó para producir virus para transducción de linfocitos. La expresión del transgén, la función, y el título retrovítico de este clon se mantuvieron en el cultivo continuo durante más de 8 semanas. Para transducción de linfocitos humanos, una placa de cultivo de 24 pocillos no de tejido tratada (Becton Dickinson, San Jose, CA) se recubrió con un fragmento de fibronectina recombinante (FN CH-296; Retronectina; Takara Shuzo, Otsu, Japón; 4 μ g/ml en PSB, durante
55 la noche a 4 °C) y se incubó dos veces con 0,5 ml de retrovirus por pocillo durante 30 minutos a 37 °C. Posteriormente de 3×10^5 a 5×10^5 linfocitos T por pocillo se transdujeron durante 48 a 72 horas usando 1 ml de virus por pocillo en presencia de 100 U/ml de IL-2. La eficiencia de transducción se determinó sobre la base del análisis de expresión del gen marcador expresado simultáneamente, la proteína fluorescente verde (GFP), en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson). Para estudios funcionales, las CTL transducidas bien no se seleccionaron o se segregaron en poblaciones con una
60 expresión baja, intermedia o elevada de GFP usando un citómetro MoFlo (Dako Cytomation, CO) según se indica.

Inducción y análisis de la apoptosis

65 CID (AP20187; ARIAD Pharmaceuticals) en las concentraciones indicadas, se añadió a los linfocitos 293T transfectados o a las CTL transducidas. Se recogieron las células adherentes y no adherentes, y se 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). Dentro de 1 hora después de la tinción, las células se analizaron mediante citometría de flujo usando el programa informático CellQuest (Becton Dickinson).

Ensayo de citotoxicidad

5 La actividad citotóxica de cada línea de CTL se evaluó en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr estandarizado de 4 horas. Las células diana incluyeron LCL autólogas, LCL sin coincidencia con el antígeno leucocitario humano (HLA) de clase I y la línea de linfoma de linfocitos T sensible a linfocitos citotóxicos activados por linfoquinas, HSB-2. Las células diana incubadas en medio completo o Triton X-100 al 1 % (Sigma, St Louis, MO) se usaron para determinar la liberación espontánea y máxima de ⁵¹Cr, respectivamente. El porcentaje medio de lisis específica de pocillos por triplicado se calculó como 100 X (liberación experimental - liberación espontánea) / (liberación máxima - liberación espontánea).

Fenotipado

15 El fenotipo de la superficie celular se investigó con los siguientes anticuerpos monoclonales: CD3, CD4, CD8 (Becton Dickinson) y CD56 y TCR- α/β (Immunotech, Miami, FL). Δ NGFR-iFas se detectó usando un anticuerpo dirigido contra NGFR (Chromaprobe, Aptos, CA). En cada experimento se utilizaron controles de isotipo (Becton Dickinson) adecuadamente emparejados. Las células se analizaron mediante un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson).

20 Análisis de la producción de citoquinas

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

Experimentos in vivo

30 Ratones no obesos diabéticos con inmunodeficiencia grave combinada (NOD SCID), de 6 a 8 semanas de edad, se irradiaron (250 rad) e inyectaron por vía subcutánea en el flanco derecho con 10×10^6 a 15×10^6 de LCL resuspendidas en Matrigel (BD Bioscience). Dos semanas después, los ratones tenían tumores de aproximadamente 0,5 cm de diámetro recibieron una inyección en la vena de la cola con una mezcla 1:1 de CTL no transducidas y con elevada transducción de VEB iCasp9.I.GFP (total 15×10^6). En 4 a 6 horas antes y 3 días después de la infusión de CTL, los ratones recibieron una inyección intraperitoneal con hIL-2 recombinante (2000 U; Proleukin; Chiron). El día 4, los ratones se segregaron aleatoriamente en 2 grupos: 1 grupo recibió CID (50 μ g de AP20187, por vía intraperitoneal) y 1 grupo recibió solamente portador (propanodiol al 16,7 %, PEG400 al 22,5 % y Tween 80 al 1,25 %, por vía intraperitoneal). El día 7 se sacrificaron los ratones. Los tumores se homogeneizaron y se tiñeron con anticuerpo dirigido contra CD3 humano (BD Pharmingen). Mediante análisis FACS, se evaluó el número de células GFP+ dentro de la población clasificada CD3⁺. Los tumores de un grupo de control de ratones que recibieron solamente CTL sin transducir (total 15×10^6) se usaron como control negativo para el análisis de las células CD30⁺/GFP+.

Optimización de la expresión y función de la caspasa-9 inducible

45 Las caspasas 3, 7 y 9 se cribaron según su idoneidad como moléculas interruptor de seguridad inducibles tanto en células 293T transfectadas como en linfocitos T humanos transducidos. Solamente la caspasa-9 inducible (iCasp9) se expresó en niveles suficientes para transmitir sensibilidad al CID seleccionado (p. ej., inductor de dimerización químico). Un cribado inicial indicó que la iCasp9 de longitud no se podía mantener de forma estable en niveles elevados en los linfocitos T, posiblemente porque las células transducidas se habían eliminado por la actividad basal del transgén. El dominio CARD está involucrado en la dimerización fisiológica de las moléculas de caspasa-9, mediante una interacción impulsada por el citocromo C y la adenosina trifosfato (ATP) con el factor activador de la proteasa apoptótica 1 (Apaf-1). Debido al uso de CID para inducir la dimerización y la activación del interruptor suicida, la función del dominio CARD es superfluo en este contexto, y la eliminación del dominio CARD se investigó como método de reducir la actividad basal. Puesto que solo la dimerización, y no la multimerización, es necesaria para activar la caspasa-9, también se investigó un solo dominio FKBP12v36 como método de realizar la activación.

55 La actividad de las formas truncadas y/o modificadas resultantes de la caspasa-9 (p. ej., el dominio CARD, o uno de los 2 dominios FKBP, o ambos, se eliminan) se comparó entre sí. Una construcción con un sitio de activación alterado, F'F-C-Casp9_{C->S}, proporcionó un control no funcional (véase la Fig. 1A). Todas las construcciones se clonaron en el vector retroviral MSCV²⁶ en el que las repeticiones terminales largas (LTR) dirigen la expresión del transgén y la GFP potenciada se expresa simultáneamente a partir del mismo ARNm mediante el uso de un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES). En los linfocitos 293T transfectados, la expresión de todas las construcciones de caspasa-9 inducible del tamaño esperado, así como la expresión simultánea de GFP, se demostró por transferencia Western (véase la Fig. 1B). La expresión de la proteína (estimada por la fluorescencia promedio de GFP y visualizada en la transferencia Western) fue mayor para la construcción no funcional F'F-C-Casp9_{C->S} y disminuyó de forma importante en la construcción de longitud completa F'F-C-Casp9. La eliminación de CARD (F'F-Casp9), un FKBP (F-C-Casp9), o ambos (F-Casp9) dio como resultado progresivamente mayor expresión tanto de caspasa-9 inducible como de GFP, y correspondientemente, una

sensibilidad mejorada a CID (véase la Fig. 1A). Basándose en estos resultados, la construcción F-Casp9 (denominada a partir de ahora en la presente memoria como iCasp9_M) se usó para estudios adicionales en linfocitos T humanos.

Expresión estable de iCasp9_M en linfocitos T humanos

La estabilidad a largo plazo de la expresión del gen suicida es de la mayor importancia, ya que los genes suicidas deben expresarse tanto tiempo como duren las células genéticamente modificadas. Para la transducción de linfocitos T se generó un clon productor retroviral derivado de FLYRD18 que produce títulos altos de un virus pseudotipado RD114 para facilitar la transducción de linfocitos T. La expresión de iCasp9_M en líneas de CTL específicas del VEB (VEB-CTL) se evaluó porque las líneas de CTL específicas del VEB tienen una función y especificidad bien caracterizada y ya se han utilizado en terapia in vivo para la prevención y el tratamiento de neoplasias malignas asociadas al VEB. Eficacias de transducción consistentes de las VEB-CTL de más del 70 % (media, 75,3 %; intervalo, 71,4 %-83,0 % en 5 donantes diferentes) se obtuvieron después de una única transducción con retrovirus. La expresión de iCasp9_M en las VEB-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 los linfocitos T transducidos

Para garantizar que la expresión de iCasp9_M no altera las características de los linfocitos T, el fenotipo, especificidad de antígeno, potencial proliferativo y función de las VEB-CTL no transducidas o las VEB-CTL transducidas con iCasp9_{C->S} no funcionales se comparó con los de las VEB-CTL transducidas con iCasp9_M. En 4 donantes independientes, las CTL transducidas y no transducidas consistieron en números iguales de células CD4⁺, CD8⁺, CD56⁺ y TCR α/β ⁺ (véase la Fig. 2A). De forma similar, la producción de citocinas incluidas IFN- γ , TNF α , IL-10, IL-4, IL-5 e IL-2 no se alteró mediante la expresión de iCasp9_M (véase la Fig. 2B). Las VEB-CTL transducidas con iCasp9_M lisaron las LCL autólogas de forma comparable a las LCT no transducidas y transducidas de control (véase la Fig. 2C). La expresión de iCasp9_M no afectó las características de crecimiento de las CTL de crecimiento exponencial y, de forma importante, la dependencia del antígeno y de IL-2 para la proliferación se preservó (véase la Fig. 2D). Las Figs. 2A y 2B representan gráficamente datos fenotípicos y de secreción de citoquinas de tipo TH1 y TH2 tras la estimulación con antígenos. La Fig. 2C ilustra gráficamente el nivel de actividad citotóxica contra la línea de linfocitos B linfoblásticoide (LCL) transformada con VEB autóloga, LCL sin coincidencia de HKA y HSB-2 (una diana de célula LAK) se compararon en CTL no transducidas (barras blancas), transducidas con F-Casp9_M (barras negras) y transducidas con F⁺F-Casp9_{C->S} (barras rayadas) específicas de VEB (VEB-CTL) entre el día 15 y el día 18 después de la transducción (2^a estimulación antigénica después de la transducción). Se muestra la media y desviación estándar de pocillos por triplicado. Se muestran los experimentos usando las VEB-CTL de 4 donantes diferentes. La Fig. 2D ilustra gráficamente la dependencia del antígeno en las células CTL transducidas con iCasp9_M. El día 21 después de la transducción, la estimulación antigénica semanal normal con LCL autólogas e IL-2 se continuó (rombos negros) o se interrumpió (cuadrados negros). La interrupción de la estimulación antigénica dio como resultado una disminución continua de linfocitos T.

Eliminación de más del 99 % de linfocitos T seleccionados para una elevada expresión del transgén vitro

iCasp9_M inducible con función en las CTL se analizó mediante monitorización de la pérdida de células que expresaban GFP tras administración de CID; 91,3 % (intervalo, 89,5 %-92,6 % en 5 donantes diferentes) de células GFP⁺ se eliminaron después de una sola dosis de CID 10 nM (véase la Fig. 3A). Se obtuvieron resultados similares independientemente del tiempo de exposición a CID (intervalo, 1 hora continuamente). En todos los experimentos, las CTL que sobrevivieron al tratamiento con CID tenían una baja expresión del transgén con una reducción del 70 % (intervalo, 55 %-82 %) en la intensidad de la fluorescencia media de GFP tras CID. No se pudo obtener ninguna eliminación adicional de linfocitos T GFP⁺ mediante estimulación antigénica seguida de una segunda dosis de CID 10 nM. Por lo tanto, con mucha probabilidad, las CTL no sensibles expresaron insuficiente iCasp9_M para una activación funcional mediante CID. Para investigar la correlación entre los bajos niveles de expresión y las CTL no sensibles a CID, las CTL se clasificaron según la expresión baja, intermedia y alta del gen marcador GFP unido y se mezcló 1:1 con las CTL no transducidas procedentes del mismo donante para permitir una cuantificación precisa del número de linfocitos T transducidos que son sensibles a la apoptosis inducida por CID.

El número de linfocitos T transducidos eliminados aumentó con el nivel de expresión del transgén GFP (véanse las Figs. 4A, 4B y 4C). Para determinar la correlación entre la expresión del transgén y la función de iCasp9_M, las VEB-CTL transducidas con iCasp9_MIRES.GFP se seleccionaron según la expresión baja (media 21), intermedia (media 80) y alta (media 189) de GFP (véase la Fig. 4A). Los linfocitos T seleccionados se incubaron durante la noche con CID 10 nM y posteriormente se tincieron con anexina V y 7-AAD. Se indican los porcentajes de las linfocitos T anexina V⁺/7-AAD⁻ y anexina V⁺7-AAD⁺ (véase la Fig. 4B). Los linfocitos T seleccionados se mezclaron 1:1 con linfocitos T no transducidos y se incubaron con CID 10 nM después de la estimulación antigénica. Se indica el porcentaje de linfocitos T positivos para GFP residual en el día 7 (véase la Fig. 4C).

Para las células seleccionadas con GFP_{alto}, CID 10 nM produjo la delección del 99,1 % (intervalo, 98,7 %-99,4 %) de células transducidas (véase la Fig. 3A). En el día de la estimulación con antígeno, las CTL transducidas con Casp9_M.I.GFP se dejaron bien sin tratar o se trataron con CID 10 nM. Siete días después, la respuesta a CID se midió mediante citometría de flujo GFP. El porcentaje de linfocitos T transducidos se ajustó al 50 % para permitir

una medición precisa de las células residuales GFP⁺ después del tratamiento con CID. Se compararon las respuestas a CID en CTL no seleccionadas (fila superior de la Fig. 3A) y seleccionadas GFP_{alta} (fila inferior de la Fig. 3A). Se indica el porcentaje de células GFP⁺ residuales (véase la Fig. 3A).

- 5 La rápida inducción de la apoptosis en las células GFP_{alta} seleccionadas se demostró mediante características apoptóticas tales como el acortamiento celular y la fragmentación en las 14 horas posteriores de la administración de CID (véase la Fig. 3B). Tras la incubación nocturna con CID 10 nM, linfocitos T transducidos con F-Casp9_M.I.GFP_{alta} tenían características apoptóticas tales como acortamiento celular y fragmentación según la evaluación microscópica. De los linfocitos T seleccionados por elevada expresión, 64 % (intervalo, 59 %-69 %) tuvieron un fenotipo apoptótico (anexina V⁺/7-AAD⁻) y 30 % (intervalo, 26 %-32 %) tuvieron un fenotipo necrótico (anexina V⁺/7-AAD⁺) (véase la Fig. 3C). La tinción con marcadores de la apoptosis mostró que el 64 % de linfocitos T tiene 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.
- 10
- 15 En contraste, la inducción de la apoptosis fue significativamente inferior en los linfocitos T seleccionados con una expresión de GFP intermedia o menor (véanse las Figs. 4A, 4B y 4C). Para las aplicaciones clínicas posteriores, pueden ser deseables versiones de las construcciones de expresión con marcadores seleccionables que permitan la selección según el alto número de copias, altos niveles de expresión, o tanto un alto número de copias como 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 deleción máximo (Fig. 3D). 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 las células GFP⁺ se midió el día 7 después de la administración de la cantidad indicada de CID. Se proporcionan la media y desviación estándar de cada punto. Se obtuvieron resultados similares usando otro inductor de dimerización químico (CID), AP1903, que
- 20
- 25 mostró clínicamente no tener prácticamente efectos adversos cuando se administró a voluntarios sanos. La respuesta a la dosis permaneció inalterada durante al menos 4 semanas después de la transducción.

iCasp9_M es funcional en células neoplásicas que expresan moléculas antiapoptóticas

- 30 La caspasa-9 se seleccionó como una molécula proapoptótica inducible para uso clínico en lugar de las ya conocidas iFas e iFADD, puesto que la caspasa-9 actúa relativamente tarde en la señalización de la apoptosis y por tanto se espera que sea menos susceptible a la inhibición mediante inhibidores de la apoptosis. Por lo tanto, se debe preservar la función suicida no solamente en las líneas de linfocitos T neoplásicas malignas que expresan moléculas antiapoptóticas, sino también en subpoblaciones de linfocitos T normales que expresan grandes cantidades de moléculas antiapoptóticas como parte del proceso para garantizar la preservación a largo plazo de los linfocitos de memoria. Para investigar adicionalmente la hipótesis, la función de iCasp9_M e iFas se comparó en primer lugar en las VEB-CTL. Para eliminar cualquier posible diferencia dependiente del vector, Fas inducible también se expresó en el vector MSCV.IRES.GFP, como la iCasp9. Para estos experimentos, tanto ΔNGFR.iFas.I.GFP como las células CTL transducidas con iCasp9_M.I.GFP se clasificaron según la expresión de GFP_{alta} y se mezclaron con células CTL no transducidas en una relación 1:1 para obtener poblaciones de células que expresan iFas o iCasp9_M en proporciones iguales a niveles similares (véase la Fig. 5A). Las VEB-CTL transducidas con ΔNGFR-iFas.I.GFP se muestran en el panel izquierdo de la Fig. 5A. Las VEB-CTL transducidas con iCasp9_M.I.GFP se muestran en el panel izquierdo de la Fig. 5A. Las VEB-CTL se clasificaron según la elevada expresión de GFP y se mezclaron 1:1 con CTL no transducidas tal como se presenta. Se indican los porcentajes de linfocitos T ΔNGFR⁺/GFP⁺ y GFP⁺.
- 35
- 40
- 45

- La eliminación de células GFP⁺ tras la administración de CID 10 nM fue más rápida y más eficaz en CTL transducidas con iCasp9_M que en las transducidas con iFas (99,2 % +/- 0,14 % de células transducidas con iCasp9_M en comparación con el 89,3 % +/- 4,9 % de células transducidas con iFas para el día 7 después de CID; P < 0,05; véase la Fig. 5B). En el día de la estimulación de las LCL, se administró CID 10 nM, y se midió GFP en los puntos temporales indicados para determinar la respuesta al CID. Los rombos negros representan los datos de ΔNGFR-iFas.I.GFP; los cuadrados negros representan los datos de iCasp9_M.I.GFP. Se muestra la media y desviación estándar de 3 experimentos.
- 50

- La función de iCasp9_M e iFas también se comparó 2 líneas de linfocitos T de neoplasia maligna: Jurkat, una línea de leucemia de linfocitos T sensible a apoptosis, y MT-2, una línea de linfocitos T resistente a apoptosis, debido a la expresión de c-FLIP y cl-xL. Células Jurkat y células MT-2 se transdujeron con iFas e iCasp9_M con eficacias similares (92 % vs 84 % en Jurkat, 76 % vs 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 indujo 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 las células MT-2 (19,3 % +/- 8,4 % y 57,9 % +/- 11,9 % para iFas e iCasp9_M, respectivamente; véase la Figura 5C).
- 55
- 60

- La líneas de linfocitos T humanos Jurkat (izquierda) y MT-2 (derecha) se transdujeron con ΔNGFR-iFas.I.GFP (fila superior de la Fig. 5C) o iCasp9_M.I.GFP (fila inferior de la Fig. 5C). Un porcentaje igual de linfocitos T se transdujeron con cada uno de los genes suicidas: 92 % para ΔNGFR-iFas.I.GFP versus 84 % para iCasp9_M.I.GFP en Jurkat, y 76 % para ΔNGFR-iFas.I.GFP versus 70 % para iCasp9_M.I.GFP in MT-2. Los linfocitos T eran bien sin tratamiento o incubadas con CID 10 nM. Ocho horas después de la exposición a CID, la apoptosis se midió por tinción con anexina V y 7-AAD. Se muestra un ejemplo representativo de 3 experimentos. PE indica ficoeritrina.
- 65

Estos resultados demuestran que en linfocitos T que expresan un exceso de moléculas inhibitoras de la apoptosis, la función de iFas se puede bloquear mientras que iCasp9_M sigue induciendo eficazmente la apoptosis.

Eliminación de linfocitos T que expresan un transgén inmunomodulador mediada por iCasp9_M

Para determinar si iCasp9_M podría destruir eficazmente células genéticamente modificadas para expresar un producto transgénico activo, se midió la capacidad de iCasp9_M para eliminar las VEB-CTL que expresan de manera estable IL-12. Aunque IL-12 fue 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. Tras la administración de CID 10 nM, sin embargo, la IL-12 en el sobrenadante cayó a niveles indetectables (< 8 pg/ml). Así, incluso sin clasificar previamente las células con elevada expresión del transgén, la activación de iCasp9_M es suficiente para eliminar completamente todos los linfocitos T que producen niveles biológicamente relevantes de IL-12 (Figura 6). La función de iCasp9_M cuando se expresa simultáneamente con IL-12 se representa gráficamente mediante un gráfico de barras en la Fig. 6. El gen marcador GFP de las construcciones iCasp9_M.I.GFP fueron sustituidos por flexi IL-12, que codifica las subunidades p40 y p35 de la IL-12 humana. Las VEB-CTL transducidas con iCasp9_M.I.GFP y con iCasp9_M.I.IL-12 se estimularon con las LCL, y después se dejaron sin tratamiento o se expusieron a CID 10 nM. Tres días después de una segunda estimulación antigénica, los niveles de IL-12 en el sobrenadante del cultivo se midieron mediante IL-12 ELISA (el límite de detección de este ensayo es 8 pg/ml). Se indica la media y desviación estándar de pocillos por triplicado. Se muestran los resultados de 1 de 2 experimentos usando VEB-CTL de 2 donantes diferentes.

Eliminación de más del 99 % de linfocitos T seleccionados para una elevada expresión del transgén in vivo

La función de iCasp9_M también se evaluó en las VEB-CTL transducidas in vivo. Se usó un modelo de xenoinjerto ratón-SCID humano para inmunoterapia adoptiva. Tras la infusión intravenosa de una mezcla 1:1 de CTL no transducidas y transducidas con iCasp9_M.IRES.GFP^{alta}- en ratones SCID que tienen un xenoinjerto LCL autólogo, los ratones se trataron bien con una sola dosis de CID o de portador, solamente. Tres días después de la administración de CID/portador, se analizaron los tumores para analizar las células CD3⁺/GFP⁺. La detección del componente no transducido del producto de infusión, usando anticuerpos dirigidos contra CD3 humanos, confirmó el éxito de la infusión en la vena de la cola de ratones que recibieron CID. En ratones tratados con CID, hubo una reducción mayor del 99 % en el número de linfocitos T CD3⁺/GFP⁺ humanos, en comparación con los ratones infundidos tratados con portador solo, demostraron también una elevada sensibilidad de linfocitos T transducidos con iCasp9_M in vivo e in vitro (véase la Fig. 7).

La función de iCasp9_M in vivo, se ilustra gráficamente en la Fig. 7. Ratones NOD/SCID se irradiaron y recibieron por vía subcutánea de 10×10^6 a 15×10^6 LCL. Tras 14 días, los ratones con tumores de 0,5 cm de diámetro recibieron un total de 15×10^6 VEB-CTL (50 % de estas células no se transdujeron, y el 50 % se transdujeron con iCasp9_M.I.GFP y se clasificaron por una elevada expresión de GFP). El día 3 después de la administración de CTL, los ratones recibieron bien CID (50 µg AP20187; (rombos negros, n=6) o portador (cuadrados negros, n=5) y en el día 6 se analizó la presencia de linfocitos T CD3⁺/GFP⁺ humanos en los tumores. Los linfocitos T CD3⁺ humanos aislados de los tumores de un grupo de control de ratones que recibieron solamente las CTL no transducidas (15×10^6 CTL; n=4) se usó como control negativo para el análisis de linfocitos T CD3⁺/GFP⁺ dentro de los tumores.

Discusión

También se describen en la presente memoria son vectores de expresión que expresan genes suicidas adecuados para eliminar los linfocitos T modificados in vivo. Los vectores de expresión de genes suicidas presentados en la presente memoria tienen algunos rasgos ventajosos no limitantes que incluyen la expresión simultánea estable en todas las células que contienen el gen modificador, expresión a niveles lo suficientemente altos para desencadenar la muerte celular, baja actividad basal, elevada actividad específica, y susceptibilidad mínima a las moléculas antiapoptóticas endógenas. También se describe en la presente memoria una caspasa-9 inducible, iCasp9_M, que tiene baja actividad basal que permite la expresión estable para más de 4 semanas en linfocitos T humanos. Una sola dosis de 10 nM de un inductor de dimerización químico (CID) de molécula pequeña es suficiente para destruir más del 99 % de las células transducidas con iCasp9_M seleccionados por una elevada expresión del transgén tanto in vitro como in vivo. Además, cuando se expresan simultáneamente con la citocina Th1 IL-12, activación de iCasp9_M eliminó todas las células productoras de IL-12, incluso sin la selección de una elevada expresión del transgén. La caspasa-9 actúa después de la mayoría de moléculas antiapoptóticas, por tanto, se preserva una elevada sensibilidad a CID independientemente de la presencia de niveles aumentados de moléculas antiapoptóticas de la familia bcl-2. Así, iCasp9_M también se puede demostrar útil para inducir la destrucción incluso de los linfocitos T transformados y 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 la caspasa-9. Los datos cristalográficos y funcionales indican que la dimerización de los monómeros de caspasa-9 inactivos llevan a una activación inducida por cambio conformacional. La concentración de pro-caspasa-9, en un escenario fisiológico, está en el intervalo de aproximadamente 20 nM, bien por debajo del umbral necesario para la dimerización.

Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que la barrera energética a la dimerización se puede superar mediante interacciones homófilas entre los dominios CARD de Apaf-1 y caspasa-9, impulsadas por el citocromo C

y ATP. La expresión en exceso de caspasa-9 unida a 2 FKBP puede permitir que se produzca la dimerización espontánea y puede tener en cuenta la toxicidad observada de la construcción de caspasa-9 de longitud completa inicial. Se observó una disminución en la toxicidad y un aumento en la expresión génica tras la eliminación de una FKBP, muy probablemente debida a una reducción en la toxicidad asociada con la dimerización espontánea.

5 Aunque la multimerización frecuentemente está implicada en los receptores de muerte superficiales, la dimerización de la caspasa-9 deberá ser suficiente para mediar la activación. Los datos presentados en la presente memoria indican que las construcciones de iCasp9 con una única función FKBP son tan eficaces como las que tienen 2 FKBP. Un aumento de la sensibilidad a CID por eliminación del dominio CARD puede representar una reducción en el umbral energético de la dimerización tras la unión de CID.

10 La persistencia y la función de los genes letales derivados de virus o bacterias, tales como HSV-TK y citosina desaminasa, se pueden alterar negativamente por respuestas inmunitarias no deseadas contra células que expresaban el virus o bacteria derivadas de genes letales. Las FKBP y las moléculas proapoptóticas que forman los componentes de iCasp9M son moléculas de origen humano y por tanto es menos probable que induzcan una respuesta inmunitaria. Aunque el enlazador entre FKBP y caspasa-9 y la única mutación puntual en el dominio FKBP introduce novedosas secuencias de aminoácidos, las secuencias no fueron inmunitariamente reconocidas por macacos receptores de linfocitos T transducidos con iFas. Adicionalmente, puesto que los componentes de iCasp9M son moléculas de origen humano, ningún linfocito T de memoria específico de las secuencias de unión debería estar presente en un receptor, a diferencia de las proteínas de origen vírico tales como HSV-TK, reduciendo de esta forma el riesgo de eliminación de linfocitos T transducidos con iCasp9M mediado por la respuesta inmunitaria.

25 Estudios anteriores usando Fas inducible o los dominios efectores de muerte (DED) de Fas asociados con las proteínas del dominio de muerte (FADD) mostraron que aproximadamente un 10 % de las células transducidas no fueron sensibles a la activación del gen destructor. Como se ha observado en los experimentos presentados en este punto, una posible explicación para la insensibilidad a CID es la baja expresión del transgén. Los linfocitos T transducidos con iCasp9M en el estudio de los inventores y los linfocitos T transducidos con Fas en estudios realizados por otros autores que sobrevivieron tras la administración de CID tenían bajos niveles de expresión del transgén. En un intento de superar un "efecto de posición" retrovírico percibido, se obtuvieron niveles crecientes de expresión homogénea del transgén mediante el flanqueo de los integrantes retrovíricos con el aislante de la cromatina de la beta-globina de pollo.

30 La adición del aislante de cromatina dio como resultado un aumento muy importante en la homogeneidad de expresión en linfocitos 293T transducidos, pero no tuvo un efecto significativo en los linfocitos T primarios transducidos. La selección de linfocitos T con elevados niveles de expresión minimizó la variabilidad de la respuesta al dimerizador. Más del 99 % de los linfocitos T transducidos clasificados según una elevada expresión de GFP se eliminaron después de una sola dosis de CID 10 nM. Esta demostración respalda la hipótesis de que las células que expresan elevados niveles de gen suicida se puede aislar con un marcador seleccionable.

35 Un número muy pequeño de células residuales resistentes que producen un resurgimiento de la toxicidad, una eficacia de delección de hasta 2 unidades logarítmicas disminuirán significativamente esta posibilidad. Para uso clínico, la expresión simultánea con un marcador seleccionable no inmunógeno tal como un NGFR, CD20 o CD34 truncado humano (p. ej., en lugar de GFP) permitirá la selección de linfocitos T que con elevada expresión del transgén. La expresión simultánea del interruptor suicida (p. ej., iCASP9M) y un marcador seleccionable adecuado (p. ej., NGFR, CD20, CD34 truncado humano, sus análogos y combinaciones de los mismos) se puede obtener usando bien un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) o modificación postraduccional de una proteína de fusión que contiene una secuencia con autoescisión (p. ej., 2A). En contraste, en situaciones donde el único riesgo de seguridad es la toxicidad mediada por transgén (p. ej., los receptores de linfocitos T artificiales, citocinas, sus análogos o combinaciones de los mismos), esta etapa de selección puede ser innecesaria, ya que una unión estrecha entre la iCasp9M y la expresión de transgén permite la eliminación de prácticamente todas las células que expresan niveles biológicamente relevantes del transgén terapéutico. Esto se demostrará mediante la expresión simultánea de iCasp9M con IL-12. La activación de iCasp9M elimina sustancialmente cualquier producción de IL-12 mensurable. El éxito de la expresión del transgén y la posterior activación del 'interruptor suicida' puede depender de la función y la actividad del transgén.

40 Otra posible explicación a la falta de sensibilidad al CID es que altos niveles de 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 bcl-2 e inhibidores de proteínas apoptóticas (IAP), que normalmente regulan el equilibrio entre apoptosis y supervivencia. Por ejemplo, la regulación positiva de c-FLIP y bcl-2 convierte una subpoblación de linfocitos T, destinada a establecer el combinado de memoria, en resistente a la muerte celular inducida por activación en respuesta a la diana análoga o a las células presentadoras de antígeno. En varios tumores linfocitos de linfocitos T, el equilibrio fisiológico entre la apoptosis y la supervivencia se altera en favor de la supervivencia celular. Un gen suicida debería eliminar prácticamente la totalidad de linfocitos T transducidos incluidos los de memoria y los linfocitos transformados de forma maligna. Por lo tanto, el gen suicida inducible seleccionado debería retener una parte significativa, si no sustancialmente la totalidad, de su actividad en presencia de niveles mayores de moléculas antiapoptóticas.

60 La ubicación apical de iFas (o iFADD) en la ruta de señalización de la apoptosis puede dejarla especialmente vulnerable a los inhibidores de la apoptosis, convirtiendo estas moléculas en menos adecuadas para ser el componente clave de un interruptor de seguridad apoptótico. La caspasa 3 o 7 parecería bien adecuada como moléculas efectoras finales, sin embargo, ninguna de ellas se pudo expresar en niveles funcionales en los

linfocitos T primarios humanos. Por lo tanto, la caspasa-9 se seleccionó como el gen suicida, puesto que la caspasa-9 actúa lo suficientemente tarde en la ruta de la apoptosis como para sortear los efectos inhibidores de c-FLIP y los miembros de la familia bcl-2 antiapoptótica, y la caspasa-9 también podría expresarse de forma estable en niveles funcionales. Aunque el inhibidor de la apoptosis vinculado a X (XIAP) podría teóricamente reducir la activación espontánea de la caspasa-9, la elevada afinidad de AP20187 (o AP1903) por FKBPV36 puede desplazar este XIAP asociado no covalentemente. Al contrario que iFas, iCasp9M permaneció funcional en una línea de linfocitos T transformados que expresan en exceso moléculas antiapoptóticas, incluida bcl-xL.

En la presente memoria se muestra un interruptor de seguridad inducible, designado específicamente para su expresión desde un vector oncorretrovírico en linfocitos T humanos. iCasp9_M se puede activar por AP1903 (o sus análogos), un inductor de la dimerización químico de molécula pequeña que ha mostrado ser seguro a la dosis requerida para un efecto de deleción óptimo y, a diferencia de rituximab, no tiene otros efectos biológicos in vivo. Por lo tanto, la expresión de este gen suicida en los linfocitos T para transferencia adoptiva puede aumentar la seguridad y también puede ampliar el ámbito de las aplicaciones clínicas.

Ejemplo 2: Uso del gen suicida iCasp9 para mejorar la seguridad de los linfocitos T alorreducidos después del trasplante de citoblastos haploidénticos

En este ejemplo se presentan construcciones de expresión y métodos para usar las construcciones de expresión para mejorar la seguridad de linfocitos T alorreducidos después del trasplante de citoblastos haploidénticos. Un vector retrovírico que codifica la iCasp9 y un marcador seleccionable (CD19 truncado) se generó como interruptor de seguridad para linfocitos T de donantes. Incluso después de la alorreducción (usando una inmunotoxina contra CD25), los linfocitos T de donantes se pudieron transducir, expandir, y posteriormente enriquecer mediante selección inmunomagnética con CD19 hasta una pureza >90 %, todo de forma eficaz. Las células diseñadas mediante ingeniería genética retuvieron la especificidad y funcionalidad antivírica, y contenían un subconjunto con fenotipo y función reguladora. La activación de iCasp9 con un dimerizador de molécula pequeña produjo rápidamente >90 % de apoptosis. Aunque la expresión del transgén está regulada negativamente en los linfocitos T quiescentes, la iCasp9 siguió siendo un gen suicida eficaz, ya que la expresión rápidamente quedó regulada positivamente en linfocitos T activados (alorreactivos).

30 Materiales y métodos

Generación de linfocitos T alorreducidos

Los linfocitos alorreducidos se generaron a partir de voluntarios sanos, como se ha presentado anteriormente. En resumen, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos se cultivaron simultáneamente con líneas celulares linfoblastoides (LCL) transformadas con el virus de Epstein Barr (VEB) en una relación de respondedor a estimulador de 40:1 en medio exento de suero (AIM V; Invitrogen, Carlsbad, CA). Después de 72 horas, los linfocitos T activados que expresaban CD25 se alorredujeron del cultivo simultáneo mediante incubación durante la noche con inmunotoxina RFT5-SMPT-dgA. Se consideró que la alorreducción era correcta si la población residual de CD3⁺CD25⁺ era <1 % y la proliferación residual según la incorporación de 3H-timidina era <10 %.

Plásmido y retrovirus

SFG.iCasp9.2A.CD19 consiste en caspasa-9 inducible (iCasp9) unida, mediante una secuencia análoga a 2A, a CD19 truncado humano (CD19; véase la Fig. 8A). iCasp9 consiste en una proteína de unión a FK5 06 humana (FKBP12; GenBank AH002 818) con una mutación F36V, conectada mediante un enlazador Ser-Gly-Gly-Gly-Ser a la caspasa-9 humana (CASP9; GenBank NM 001229). La mutación F36V aumenta la afinidad de unión de FKBP12 con el homodimerizador sintético, AP20187 o AP1903. El dominio de reclutamiento de la caspasa (CARD) se ha eliminado de la secuencia de la caspasa-9 humana porque su función fisiológica se ha sustituido por FKBP12, y su eliminación aumenta la expresión y la función del transgén. La secuencia análoga a 2A codifica un péptido de 20 aminoácidos del virus de insecto *Thosea* asigna, que media >99 % de la escisión entre una glicina y un resto de prolina del extremo, dando como resultado 19 aminoácidos adicionales en el extremo C de la iCasp9, y un resto de prolina adicional en el extremo N de CD19. CD19 consiste en CD19 de longitud completa (GenBank NM 001770) truncado en el aminoácido 333 (TDPTRRF), que acorta el dominio intracitoplasmático de 242 a 19 aminoácidos, y elimina todos los restos de tirosina conservados que son sitios de fosforilación potenciales.

Un clon PG13 productor del retrovirus de la leucemia de gibón (Gal-V) pseudotipado se preparó transfectando transitoriamente la línea celular Phoenix Eco (producto ATCC n.º SD3444; ATCC, Manassas, VA) con SFG.iCasp9.2A.CD19. Esto produjo un retrovirus Eco-pseudotipado. La línea celular de empaquetamiento PG13 (ATCC) se transdujo tres veces con retrovirus Eco-pseudotipado para generar una línea productora que contenía múltiples integrantes SFG.iCasp9.2A.CD19 províricos por célula. Se realizó la clonación de una sola célula, y el clon PG13 que produjo el título más alto se expandió y se utilizó para la producción del vector.

Transducción retrovírica

El medio de cultivo para la activación y expansión de los linfocitos T consistió en RPMI 1640 al 45 % (Hyclone, Logan, UT), Clicks al 45 % (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) y suero de feto de bovino al 10 % (FBS; Hyclone). Los linfocitos alorreducidos se activaron mediante un anticuerpo inmovilizado contra CD3 (OKT3; Ortho Biotech, Bridgewater, NJ) durante 48 horas antes de la transducción con el vector retrovítico (véase la Fig. 8B). La Fig. 8B presenta un panorama general del proceso para la producción del “producto celular final” que expresa el transgén transducido. La alorreducción selectiva se realizó mediante cultivo simultáneo de PBMC de donantes con VEB-LCL del receptor para activar las células alorreactivas: los linfocitos activados expresaron CD25 y posteriormente se eliminaron mediante inmunotoxina contra CD25. Los linfocitos alorreducidos se activaron mediante OKT3 y se transdujeron con el vector retrovítico 48 horas después. La selección inmunomagnética se realizó en el día 4 de la transducción; la fracción positiva se amplió durante 4 días más y se crioconservó.

En experimentos a pequeña escala, placas de cultivo no de tejido tratadas de 24 pocillos (Becton Dickinson, San Jose, CA) se recubrieron con OKT3 1 g/ml durante de 2 a 4 horas a 37 °C. Los linfocitos alorreducidos se añadieron a 1×10^6 células por pocillo. A las 24 horas, se añadieron 100 U/ml de interleucina 2 recombinante humana (IL-2) (Proleukin; Chiron, Emeryville, CA). La transducción retrovítica se realizó 48 horas después de la activación. Placas de cultivo de 24 pocillos no de tejido tratada se recubrió con $3,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de un fragmento de fibronectina recombinante (CH-296; Retronectina; Takara Mirus Bio, Madison, WI) y los pocillos se cargaron dos veces con sobrenadante que contenía vector retrovítico a 0,5 ml por pocillo durante 30 minutos a 37 °C, después de lo cual, los linfocitos activados con OKT3 se sembraron en placas a 5×10^5 células por pocillo en sobrenadante que contenía vector retrovítico nuevo, y el medio de cultivo de linfocitos T en una relación de 3:1, suplementado con 100 U/ml de IL-2. Las células se recogieron después de 2 o 3 días y se expandieron en presencia de 50 U/ml de IL-2.

Escalado de la producción de los linfocitos alorreducidos modificados genéticamente

El escalado del proceso de transducción para su aplicación clínica usó frascos de cultivo no de tejido T75 tratados (Nunc, Rochester, NY), que se recubrieron con 10 ml de OKT3 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o 10 ml de fibronectina 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 4 °C durante la noche. También se usaron bolsas de etileno-propileno fluorado tratados con corona para aumentar la adherencia celular (2PF-0072AC, American Fluoroseal Corporation, Gaithersburg, MD). Los linfocitos alorreducidos se sembraron en frascos recubiertos de OKT3 a 1×10^6 células/ml. Al día siguiente se añadieron 100 U/ml de IL-2. Para la transducción del retrovirus, los frascos o bolsas recubiertos con retronectina se llenaron una vez con 10 ml de sobrenadante que contenía retrovirus durante de 2 a 3 horas. Los linfocitos T activados con OKT3 se sembraron a 1×10^6 células/ml en medio que contenía vector retrovítico nuevo y medio de cultivo de linfocitos T en una relación de 3:1, suplementado con 100 U/ml de IL-2. Las células se recogieron la mañana siguiente, y se expandieron en frascos de cultivo tisular T75 o T175 tratados en medio de cultivo suplementado con entre aproximadamente 50 y 100 U/ml de IL-2 a una densidad de siembra de entre aproximadamente 5×10^5 células/ml y 8×10^5 células/ml.

Selección inmunomagnética de CD19

La selección inmunomagnética de CD19 se realizó 4 días después de la transducción. Las células se marcaron con microperlas magnéticas conjugadas con anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos contra CD19 humano (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) y se seleccionaron en columnas MS o LS en experimentos a pequeña escala y en un dispositivo de selección automatizada ClniMacs Plus en experimentos a gran escala. Las células seleccionadas según CD19 se expandieron durante 4 días más y se crioconservaron el día 8 después de la transducción. Estas células se denominará como “linfocitos alorreducidos genéticamente modificados”.

Inmunofenotipado y análisis de pentámeros

El análisis mediante citometría de flujo (FACSCalibur y programa informático CellQuest; Becton Dickinson) se realizó usando los siguientes anticuerpos: CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, CD27, CD28, CD45RA, CD45RO, CD56 y CD62L. Se descubrió que CD19-PE (Clon 4G7; Becton Dickinson) proporcionaba la tinción óptima y se utilizó en todos los análisis posteriores. Se utilizó un control no transducido para configurar la clasificación negativa para CD19. Se usó un pentámero de HLA, HLA-B8-RAKFKQLL (Proimmune, Springfield, VA) para detectar los linfocitos T que reconocían un epíteto del antígeno lítico del VEB (BZLF1). El pentámero HLA-A2-NLVPMVATV se utilizó para detectar linfocitos T que reconocían un epitopo del antígeno CMV-pp65.

Ensayo de interferón-ELISpot para determinar la respuesta antivírica

Se realizó el ensayo de interferón-ELISpot para evaluar las respuestas a los antígenos del VEB, CMV y adenovirus usando métodos conocidos. Los linfocitos alorreducidos modificados genéticamente crioconservados a los 8 días después de la transducción se descongelaron y se dejaron reposar durante la noche en medio completo sin IL-2 antes de usarlos como células respondedoras. PBMC crioconservados del mismo donante se utilizaron como comparativo. Las células respondedoras se sembraron en placas por duplicado o triplicado en diluciones en serie de 2×10^5 , 1×10^5 , 5×10^4 y $2,5 \times 10^4$ células por pocillo. Las células estimuladoras se sembraron en placas a 1×10^5 por pocillo. Para determinar la respuesta al VEB, VEB-LCL derivadas de donante irradiadas a 40 Gy se usaron como estimuladores. Para determinar la respuesta al adenovirus, se usaron monocitos activados derivados del donante infectados con el adenovirus Ad5f35.

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

Citotoxicidad específica del VEB

Los linfocitos alorreducidos modificados genéticamente se estimularon con VEB-LCL derivadas de donante irradiadas a 40 Gy en una relación de respondedor:estimulador de 40:1. Después de 9 días, los cultivos se volvieron a estimular a una relación de respondedor:estimulador de 4:1. La reestimulación se realizó semanalmente como se ha indicado. Después de dos o tres rondas de estimulación, la citotoxicidad se midió en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr de 4 horas, usando las VEB-LCL del donante como células diana y blastos OKT3 del donante como controles autólogos. La actividad NK se inhibió añadiendo un exceso de 30 veces de células K562 frías.

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

La funcionalidad del gen suicida se evaluó añadiendo un homodimerizador sintético de molécula pequeña, AP20187 (Ariad Pharmaceuticals; Cambridge, MA), a una concentración final de 10 nM el día después de la selección inmunomagnética de CD19. Las células se tiñeron con anexina V y 7-aminoactinomicina (7-AAD)(BD Pharmingen) a 24 horas y se analizaron mediante citometría de flujo. Las células negativas tanto para anexina V como para 7-AAD se consideraron viables, las células positivas para anexina V eran apoptóticas y las células que eran positivas tanto para anexina V como para 7-AAD eran necróticas. El porcentaje de destrucción inducida por la dimerización se corrigió según la viabilidad inicial de la siguiente forma: Porcentaje de destrucción = 100 % - (% Viabilidad en células tratadas con AP20187 ÷ % Viabilidad en células no tratadas).

Evaluación de la expresión del transgén tras cultivo prolongado y reactivación

Las células se mantuvieron en medio de linfocitos T que contenía 50 U/ml de IL-2 hasta 22 días después de la transducción. Una parte de las células se reactivaron en placas de 24 pocillos recubiertas con 1 g/ml de OKT3 y 1 µg/ml 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 suicida en células tanto reactivadas como no reactivadas se midió el día 24 o 25 después de la transducción.

En algunos experimentos, las células también se cultivaron durante 3 semanas después de la transducción y se estimularon con PBMC alogénicas irradiadas con 30 Gy en una relación de respondedor:estimulador de 1:1. Después de 4 días de cultivo simultáneo, una parte de las células se trataron con AP20187 10 nM. La destrucción se midió por tinción con anexina V/7-AAD a las 24 horas, y el efecto del dimerizador sobre los linfocitos T específicos de virus con doble tinción se evaluó mediante análisis de pentámeros en células tratadas con AP20187 y no tratadas.

Linfocitos T reguladores

La expresión de CD4, CD25 y Foxp3 se analizó en los linfocitos alorreducidos modificados genéticamente usando citometría de flujo. Para la tinción de Foxp3, se usó el kit de tinción de eBioscience (San Diego, CA) con un control de isotipo de IgG2a de rata adecuado. Estas células se tiñeron simultáneamente con CD25-FITC de superficie y CD4-PE.- El análisis funcional se realizó mediante cultivo simultáneo con linfocitos CD4⁺25⁺ seleccionados después de alorreducción y modificación genética con PBMC autólogas marcadas con diacetato de carboxifluoresceína N-succinimidil éster (CFSE). La selección de CD4⁺25⁺ se realizó reduciendo en primer lugar los linfocitos CD8⁺ usando perlas con anti-CD8 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA), seguido por selección positiva usando microperlas anti-CD25 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). El marcado con CFSE se realizó incubando PBMC autólogas a 2 × 10⁷/ml en suero salino tamponado con fosfato que contenía CFSE 1,5 µM durante 10 minutos. La reacción se detuvo por adición de un volumen equivalente de FBS e incubación durante 10 minutos a 37 °C. Las células se lavaron dos veces antes de usarlas. Las PBMC marcadas con CFSE se estimularon con OKT3 500 ng/ml y PBMC alogénicas irradiadas con 40 Gy alimentadoras en una relación PBMC:alimentador alogénico de 5:1. Después, las células se cultivaron con o sin un número igual de linfocitos CD4⁺25⁺ autólogos alorreducidos modificados genéticamente. Después de 5 días de cultivo, la división celular se analizó mediante citometría de flujo. Se usó CD19 para clasificar los linfocitos T CD4⁺25⁺ modificados genéticamente no marcados con CFSE.

Análisis estadístico

Se usó la prueba de la t de Student emparejada bilateral para determinar la significación estadística de las diferencias entre muestras. Todos los datos representados son media ± 1 desviación estándar.

Resultados

Los linfocitos T alorreducidos selectivamente pueden transducirse eficazmente con iCasp9 y expandirse

Se realizó la alorreducción selectiva según los procedimientos del protocolo clínico. En resumen, de 3/6 a 5/6 PBMC sin coincidencia de HLA y líneas celulares linfoblastoides (LCL) se cultivados conjuntamente. La inmunotoxina RFT5-SMPT-dgA se aplicó después de 72 horas de cultivo conjunto y produjo con fiabilidad linfocitos alorreducidos con una proliferación residual <10 % (media 4,5 ± 2,8 %; intervalo de 0,74 a 9,1 %; 10 experimentos) y contenía <1 % residual de linfocitos CD3⁺CD25⁺ (media 0,23 ± 0,20 %; intervalo de 0,06 a 0,73 %; 10 experimentos), satisfaciendo de esta manera los criterios de liberación de la alorreducción selectiva, y sirviendo como materiales de partida para la manipulación posterior.

Los linfocitos alorreducidos activados sobre OKT3 inmovilizado durante 48 horas se pudieron transducir eficazmente con un vector retrovírico con pseudotipado Gal-V que codificaba SFG.iCasp9.2A.CD19. La eficacia de la transducción evaluada mediante análisis FACS para la expresión de CD19 de 2 a 4 días después de la transducción fue de aproximadamente 53 %±8 %, con resultados comparables para transducción a pequeña escala (placas de 24 pocillos) y a gran escala (frascos T75) (aproximadamente 55 ± 8 % versus aproximadamente 50 % ± 10 % en 6 y 4 experimentos, respectivamente). El número de células se contrajo en los 2 primeros días después de la activación de OKT3 de manera que solo aproximadamente un 61 % ± 12 % (intervalo de aproximadamente 45 % a 80 %) de los linfocitos alorreducidos se habían recuperado el día de la transducción (véase la Fig. 9). En la Fig. 9 se ilustran gráficamente los resultados de experimentos realizados para determinar si los linfocitos alorreducidos se podían expandir correctamente después de la transducción. Los rombos negros denotan experimentos realizados a gran escala en frascos y bolsas. Los círculos blancos denotan experimentos realizados a pequeña escala en placas de 24 pocillos. Después, 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) respecto de los 8 días posteriores, dando como resultado una expansión neta de 58 ± 33 veces. La expansión celular en experimentos tanto a pequeña como a gran escala fue similar, siendo la expansión neta de aproximadamente 45 ± 29 veces (intervalo de aproximadamente 25 a aproximadamente 90) en 5 experimentos a pequeña escala y aproximadamente 79 ± 34 veces (intervalo de aproximadamente 50 a aproximadamente 116) en 3 experimentos a gran escala.

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

La eficacia de la activación del gen suicida depende, algunas veces, de la funcionalidad del propio gen suicida y, a veces, del sistema de selección utilizado para enriquecer en células modificadas genéticamente. El uso de CD19 como marcador seleccionable se investigó para determinar si la selección con CD19 permite la selección de células modificadas genéticamente con pureza y rendimiento suficientes, y si la selección tenía algún efecto perjudicial sobre el posterior crecimiento celular. La selección a pequeña escala se realizó según las instrucciones del fabricante; sin embargo, se determinó que la selección a gran escala era óptima cuando se usaban 10 l de microperlas de CD19 por 1,3 × 10⁷ células. Se realizó el análisis FACS 24 horas después de la selección inmunomagnética para minimizar la interferencia derivada de las microperlas de CD19. La pureza de las células tras la selección inmunomagnética fue consistentemente superior al 90 %: el porcentaje medio de linfocitos CD19⁺ estuvo en el intervalo de aproximadamente 98,3 % ± 0,5 % (n=5) en selecciones a pequeña escala y en el intervalo de aproximadamente 97,4 %±0,9 % (n=3) en selecciones a gran escala con CliniMacs (véase la Fig. 10).- En la Fig. 10 se muestran trazas de un análisis FACS representativo de la selección inmunomagnética realizada 2 días después de la transducción.

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

Inmunofenotipo de los linfocitos alorreducidos modificados genéticamente

Se determinó el inmunofenotipo del producto celular final (linfocitos alorreducidos modificados genéticamente que se han crioconservado durante 8 días después de la transducción), y se descubrió que contenía linfocitos tanto CD4 como CD8, siendo predominante CD8, con un 62 % ± 11 % CD8⁺ versus 23 % ± 8 % CD4⁺, como se muestra en la siguiente tabla. NS= no significativo, SD= desviación estándar.

Tabla 1

	PBMC no manipuladas (media % ± SD)	Linfocitos alorreducidos modificados genéticamente (media % ± SD)	
Linfocitos T: Total CD3 ⁺	82 ± 6	95 ± 6	NS
CD3 ⁺ 4 ⁺	54 ± 5	23 ± 8	p < 0,01

CD3 ⁺ 8 ⁺	26 ± 9	62 ± 11	p < 0,001
linfocitos 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 los linfocitos fueron CD45RO⁺ y tenían el inmunofenotipo superficial de linfocitos T efectores de memoria. La expresión de los marcadores de memoria, incluidos CD62L, CD27 y CD28, fue heterogénea. Aproximadamente un 24 % de los linfocitos expresaron CD62L, una molécula constitutiva de los ganglios linfáticos que se expresa en los linfocitos de memoria central.

Los linfocitos alorreducidos modificados genéticamente retuvieron el repertorio antivírico y la funcionalidad

La capacidad de los productos celulares finales para mediar en la inmunidad antivírica se evaluó mediante el ensayo de citotoxicidad con interferón ELISpot y el análisis de pentámeros. Los linfocitos alorreducidos modificados genéticamente crioconservados se utilizaron en todos los análisis, ya que eran representativos del producto actualmente en evaluación para su uso en un estudio clínico. La secreción de interferón- γ en respuesta a antígenos de adenovirus, CMV o VEB presentados por células donantes se conservó aunque se observó una tendencia hacia una respuesta anti-EBV reducida en linfocitos alorreducidos modificados genéticamente versus las PBMC no manipuladas (véase la Fig. 11A). En la Fig. 11A se ilustran los resultados de los estudios de secreción de interferón. La respuesta a los antígenos víricos se evaluó mediante ELISpot en 4 parejas de PBMC no manipuladas y linfocitos alorreducidos modificados genéticamente (GMAC). Los antígenos de adenovirus y CMV se presentaron mediante monocitos activados procedentes de donantes mediante infección con el vector nulo Ad5f35 y el vector Ad5f35-pp65, respectivamente. Los antígenos de VEB se presentaron mediante VEB-LCL de donantes. El número de unidades formadoras de manchas (UFM) se corrigió para los pocillos que solo tenían estimulador y respondedor. Solamente tres de los cuatro donantes fueron evaluables para la respuesta de CMV, se excluyó un donante seronegativo. En la Fig. 11A, las barras horizontales representan la mediana.

La citotoxicidad se evaluó usando las VEB-LCL derivadas de donante como dianas. Los linfocitos alorreducidos modificados genéticamente que habían tenido 2 o 3 rondas de estimulación con VEB-LCL derivadas de donantes pudieron lisar eficazmente las células diana autólogas infectadas con virus (véase la Fig. 11B). En la Fig. 11B se presentan los resultados de los ensayos de citotoxicidad. Los linfocitos alorreducidos modificados genéticamente se estimularon con las VEB-LCL de donantes durante 2 o 3 ciclos. El ensayo de liberación de ⁵¹Cr se realizó usando VEB-LCL derivadas de donantes y blastos OKT3 de donantes como dianas. La actividad NK se bloqueó con un exceso de 30 veces en de K562 frío. El panel izquierdo muestra resultados de 5 experimentos independientes usando parejas de donante-receptor no coincidentes o con coincidencia parcial. El panel derecho muestra resultados de 3 experimentos usando parejas de donante-receptor haploidénticos para HLA no relacionados. Las barras de error indican promedio \pm SEM.

Las VEB-LCL se usaron como células presentadoras de antígenos durante la alorreducción selectiva; por tanto, fue posible reducir significativamente los linfocitos T específicos de VEB cuando el donante y el receptor eran haploidénticos. Para investigar esta hipótesis, se incluyeron tres experimentos usando parejas de donante-receptor haploidénticos para HLA no relacionados, y los resultados mostraron que la citotoxicidad contra las VEB-LCL derivadas de donantes se retenía. Los resultados se corroboraron mediante el análisis de pentámeros para linfocitos T que reconocían HLA-B8-RAKFKQLL, un epítipo del antígeno lítico del VEB (BZLF1), en dos donantes indicadores tras la alorreducción contra receptores haploidénticos negativos para HLA-B8 (véase la Fig. 11C). La Fig. 11C ilustra la frecuencia de linfocitos T específicos del epítipo BZLF1. Como comparadores, se usaron PBMC no manipuladas. La población positiva para el pentámero RAK se retuvo en los linfocitos alorreducidos modificados genéticamente y se pudieron expandir después de varias rondas de estimulación in vitro con VEB-LCL derivadas de donantes. Los porcentajes mostrados en la gráfica presentada en la Fig. 11C indican el porcentaje de células positivas para el pentámero dentro de la porcentaje de CD8. En su conjunto, estos resultados indican que los linfocitos alorreducidos modificados genéticamente retienen una funcionalidad antivírica significativa.

Linfocitos T reguladores en la población de linfocitos alorreducidos modificados genéticamente

Se usaron la citometría de flujo y el análisis funcional para determinar si linfocitos T reguladores quedaban retenidos en el producto de linfocitos T alorreducidos modificados genéticamente de los inventores. Se descubrió una población Foxp3⁺ CD4⁺25⁺, como se muestra en la Fig. 12A. Tras la separación inmunomagnética, la fracción enriquecida en CD4⁺CD25⁺ demostró función supresora cuando se cultivó simultáneamente con PBMC autólogas

marcadas con CFSE en presencia de OKT3 y alimentadores alogénicos (véase la Fig. 12B). La Fig. 12B ilustra los resultados de un ensayo funcional de CD4⁺CD25⁺. Las PBMC derivadas de donantes se marcaron con CFSE y se estimularon con OKT3 y alimentadores alogénicos. Los linfocitos CD4⁺CD25⁺ se seleccionaron de forma inmunomagnética entre la población de linfocitos modificados genéticamente y se añadieron a los pocillos en una proporción 1:1. La citometría de flujo se realizó transcurridos 5 días. Los linfocitos T modificados genéticamente se clasificaron según la expresión de CD19. La adición de linfocitos modificados genéticamente CD4⁺CD25⁺ (panel inferior) redujo significativamente la proliferación celular. De esta forma, los linfocitos T alorreducidos pueden readquirir el fenotipo regulador incluso después de su exposición a una inmunotoxina reductora de CD25.

5
10 Los linfocitos alorreducidos modificados genéticamente se eliminaron eficaz y rápidamente por adición del inductor de la dimerización químico

El día siguiente la selección inmunomagnética se añadió una solución 10 nM del inductor de la dimerización químico, AP20187, para inducir la apoptosis, que apareció en un plazo de 24 horas. El análisis FACS con tinción con anexina V y 7-AAD a las 24 horas mostraron que solo aproximadamente 5,5 %±2,5 % de células tratadas con AP20187 permanecieron viables, mientras que aproximadamente un 81,0 %±9,0 % de las células no tratadas fueron viables (véase la Fig. 13A). La eficacia de destrucción tras la corrección según la viabilidad inicial fue de aproximadamente 92,9 % ± 3,8 %. La selección de CD19 a gran escala produjo células que se destruyeron con una eficacia similar a la selección a pequeña escala: la viabilidad media con y sin AP20187, y el porcentaje de destrucción, a gran y pequeña escala, fueron aproximadamente 3,9 %, aproximadamente 84,0 %, aproximadamente 95,4 % (n=3) y aproximadamente 6,6 %, aproximadamente 79,3 %, aproximadamente 91,4 % (n=5) respectivamente. AP20187 fue no tóxico para las células no transducidas: la viabilidad con y sin AP20187 fue de aproximadamente 86 % ± 9 % y 87 % ± 8 % respectivamente (n=6).

15
20
25 La expresión del transgén y la función disminuyeron con el cultivo prolongado, pero se restauraron tras la reactivación celular

Para evaluar la estabilidad de la expresión del transgén y la función, los linfocitos se mantuvieron en medio de cultivo para linfocitos T y una dosis baja de IL-2 (50 U/ml) hasta 24 días después de la transducción. A continuación, una parte de los linfocitos se reactivaron con OKT3/anti-CD28. La expresión de CD19 se analizó mediante citometría de flujo de 48 a 72 horas después, y la función del gen suicida se evaluó por tratamiento con AP20187 10 nM. Los resultados mostrados en la Fig. 13B son para las células desde el día 5 después de la transducción (es decir, 1 día después de la selección de CD19) y el día 24 después de la transducción, con o sin 48-72 horas de reactivación (5 experimentos). En 2 experimentos, la selección de CD25 se realizó después de la activación con OKT3/aCD28 para enriquecer adicionalmente las células activadas. Las barras de error representan la desviación estándar. * indica p<0,05 cuando se compara con las células del 5 después de la transducción. En el día 24, la expresión superficial de CD19 bajó de aproximadamente 98 % ± 1 % a aproximadamente 88 % ± 4 % (p<0,05) con una disminución paralela en la intensidad de fluorescencia media (IFM) de 793±128 a 478 ± 107 (p<0,05) (véase la Fig. 13B). Análogamente, se produjo una reducción significativa en la función del gen suicida: la viabilidad residual fue 19,6 ± 5,6 % después del tratamiento con AP20187; tras la corrección según la viabilidad inicial de 54,8 ± 20,9 %, esto es igual a una eficacia de destrucción de solo el 63,1 ± 6,2 %.

30
35
40
45
50 Para determinar si la disminución en la expresión del transgén con el tiempo se debía a una reducción en la transcripción tras la quiescencia de los linfocitos T o para eliminar las células transducida, una parte de las células se reactivaron el día 22 después de la transducción con OKT3 y anticuerpo contra CD28. De 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 88 % ± 4 % a aproximadamente 93 % ± 4 % (p<0,01) y la IMF de CD19 aumentó de 478 ± 107 a 643 ± 174 (p<0,01). Adicionalmente, la función suicida también aumentó significativamente de aproximadamente a 63,1 % ± 6,2 % la eficacia de destrucción a aproximadamente a 84,6 % ± 8,0 % (p<0,01) la eficacia de destrucción. Además, la eficacia de destrucción quedó completamente restaurada si las células se clasificabas inmunomagnéticamente según el marcador de activación CD25: la eficacia de destrucción de las células positivas para CD25 fue de aproximadamente 93,2 % ± 1,2 %, que fue la misma que la eficacia de destrucción el día 5 después de la transducción (93,1 ± 3,5 %) (véase la Fig. 13C). La destrucción de la fracción negativa para CD25 fue de 78,6 ± 9,1 %. En la Fig. 13C se ilustran gráficas FACS representativas que muestran el efecto de un cultivo prolongado y la activación de los linfocitos T tras el funcionamiento del gen suicida.

55
60
65 Una observación a resaltar fue que muchos linfocitos T específicos de virus se preservaron cuando se usó el dimerizador para reducir los linfocitos genéticamente modificados que se han reactivados con las PBMC alogénicas, en lugar de estímulos mitógeno no específicos. Después de 4 días de reacción con células alogénicas, como se muestra en las Figs. 14A y 14B, el tratamiento con AP20187 preserva (y por lo tanto enriquece) las subpoblaciones víricas reactivas, tal como se muestra por la proporción de linfocitos T reactivos con los pentámeros de HLA específicos de péptidos derivados del VEB y el CMV. Los linfocitos alorreducidos modificados genéticamente se mantuvieron en cultivo durante 3 semanas después de la traducción para permitir la modulación defectiva. Las células se estimularon con PBMC alogénicas durante 4 días después de lo cual, una parte se trató con AP20187 10 nM. La frecuencia de linfocitos T específicos del VEB (véase la Fig. 14A) y los linfocitos T específicos del CMV (véase la Fig. 14B) se cuantificaron mediante análisis de pentámeros antes de la aloestimulación, después de la aloestimulación, y después del tratamiento de las células aloestimuladas con el

dimerizador. El porcentaje de linfocitos T específicos de virus disminuyó después de la aloestimulación. Después del tratamiento con el dimerizador, los linfocitos T específicos de virus quedaron parcial y preferentemente retenidos.

Discusión

5 La factibilidad los linfocitos T genéticamente modificados con dos mecanismos de seguridad distintos, la alorreducción selectiva y la modificación con gen suicida se han demostrado en la presente memoria. En su conjunto, estas modificaciones pueden modificar y/o potenciar la retroadición de cantidades sustanciales de linfocitos T con actividad antivírica y antitumoral, incluso después del trasplante haploidéntico. Los datos presentados en la presente memoria muestran que el gen suicida, iCasp9, funciona eficazmente (>90 % de apoptosis después del tratamiento con el dimerizador) y que la regulación defectiva de la expresión del transgén que se produce con el tiempo se revertió rápidamente tras la activación de los linfocitos T, como se produciría cuando los linfocitos T alorreactivos encuentran sus dianas. Los datos presentados en la presente memoria muestran también que CD19 es un marcador seleccionable adecuado que permite una selección eficaz y un enriquecimiento selectivo de los linfocitos transducidos hasta el >90 % de pureza. Además, los datos presentados en la presente memoria indican que estas manipulaciones no tuvieron efectos discernibles sobre la competencia inmunitaria de los linfocitos T genéticamente modificados con retención de la actividad antivírica, y regeneración de una población CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ con actividad Treg.

20 Dado que la funcionalidad global de los genes suicidas depende tanto del propio gen suicida como del marcador utilizado para seleccionar las células transducidas, su traducción a uso clínico requiere la optimización de ambos componentes, y del método utilizado para acoplar la expresión de los dos genes. Los dos marcadores seleccionables más utilizados actualmente en la práctica clínica tienen inconvenientes. La neomicina fosfotransferasa (neo) codifica una proteína extraña inmunógena y requiere un cultivo de 7 días en un medio de selección, lo que no solo aumenta la complejidad del sistema, sino que también daña potencialmente los linfocitos T específicos de virus. Un marcador de selección de superficie ampliamente utilizado, LNGFR, ha suscitado recientemente problemas, relativos a su potencial oncogénico y potencial correlación con la leucemia, en un modelo de ratón, a pesar de su aparente seguridad clínica. Adicionalmente, la selección de LNGFR no está ampliamente disponible, debido a que se utiliza exclusivamente en terapia génica. Se han sugerido numerosos marcadores seleccionables alternativos. CD34 se ha estudiado bien in vitro, pero las etapas necesarias para optimizar un sistema configurado principalmente para la selección de progenitores hematopoyéticos raros y, de forma más crítica, el potencial de linfocitos T constituyentes alterados in vivo, convierten a CD34 en algo menos que óptimo para su uso como marcador seleccionable para una construcciones de expresión del interruptor suicida. CD19 se seleccionó como un marcador seleccionable alternativo, ya que la selección de CD19 con calidad clínica es un método fácilmente disponible para la reducción de linfocitos B en autoinjertos de citoblastos. Los resultados presentados en la presente memoria demostraron que el enriquecimiento en CD19 se podría realizar con elevada pureza y rendimiento y que, además, el proceso de selección no tiene efectos discernibles sobre el crecimiento y la funcionalidad celular posteriores.

40 La eficacia de la activación del gen suicida en células iCasp9 seleccionadas para CD19 se compara muy favorablemente con el de las células seleccionadas con neo o LNGFR transducidas para expresar el gen HSVtk. Las generaciones anteriores de construcciones HSVtk proporcionaron una supresión de 80-90 % de la captación de 3H-timidina y mostraron una reducción similar en la eficacia de destrucción tras cultivo in vitro prolongado, pero no fueron en ningún caso clínicamente eficaces. La resolución completa de la GVHD tanto aguda como crónica se ha notificado con una reducción in vivo tan baja como el 80 % en linfocitos genéticamente modificados en circulación. Estos datos respaldan la hipótesis de que no es probable que la regulación defectiva transgénica observada in vitro sea un problema, porque los linfocitos T activados responsables de la GVHD regularán positivamente la expresión génica y, por tanto, se eliminarán selectivamente in vivo. Que este efecto sea suficiente para permitir la retención de linfocitos T específicos de virus y de leucemia, se estudiará en un escenario clínico. Al combinar la alorreducción selectiva antes de la modificación del gen suicida, la necesidad de activar el mecanismo del gen suicida se puede reducir significativamente, maximizando de esta forma las ventajas de las terapias basadas en volver a agregar linfocitos T.

50 La alta eficacia del gen suicida mediada por iCasp9 observada in vitro se ha replicado in vivo. En un modelo de xenoinjerto de ratón SCID ser humano, más del 99 % de los linfocitos T modificados con iCasp9 se eliminaron después de una sola dosis del dimerizador. AP1903, que tiene una equivalencia química y funcional extremadamente cercana a AP20187, y que actualmente se ha propuesto para su uso en aplicaciones clínicas, se ha ensayado con seguridad en voluntarios humanos sanos y ha mostrado ser seguro. Un nivel plasmático máximo comprendido entre aproximadamente 10 ng/ml y aproximadamente 1275 ng/ml AP1903 (equivalente a entre aproximadamente 7 nM y aproximadamente 892 nM) se alcanzó para un intervalo de dosis de 0,01 mg/kg a 1,0 mg/kg administrado como infusión intravenosa de 2 horas. No se produjeron prácticamente efectos adversos significativos. Después de permitir una rápida redistribución en plasma, la concentración del dimerizador utilizado in vitro permanece fácilmente disponible in vivo.

60 Las condiciones de cultivo óptimas para mantener la inmunocompetencia de los linfocitos T modificados con el gen suicida se deben determinar y definir para cada combinación de interruptor de seguridad, marcador seleccionable y tipo celular, ya que el fenotipo, el repertorio y la funcionalidad se pueden alterar, todos ellos, por la estimulación utilizada en la activación de linfocitos T policlonales, el método para seleccionar las células transducidas, y la duración del cultivo. La adición de coestimulación con CD28 y el uso de perlas paramagnéticas de tamaño celular para generar células modificadas genéticamente que se parezcan aún más a las PBMC no manipuladas en lo que respecta a la relación CD4/CD8, y la expresión de los marcadores de los subconjuntos de memoria incluidos los ganglios linfáticos que albergan moléculas

CD62L y CCR7, puede mejorar la funcionalidad in vivo o linfocitos T modificados genéticamente. La coestimulación con CD28 también puede aumentar la eficacia de la transducción y expansión del retrovirus. De forma interesante, sin embargo, se ha descubierto que la adición de coestimulación con CD28 no altera la transducción de los linfocitos alorreducidos, y el grado de expansión celular demostró ser alto en comparación con el brazo que solamente tenía anti-CD3 en otros estudios. Adicionalmente, los linfocitos alorreducidos modificados con iCasp9 retuvieron una funcionalidad antivírica significativa, y aproximadamente un cuarto retuvieron la expresión de CD62L. También se observó la regeneración de linfocitos T reguladores CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. Los linfocitos alorreducidos usados como material de partida en la activación y transducción de linfocitos T pueden haberse considerado menos sensibles a la adición de anticuerpo dirigido contra CD28 y estimulación simultánea. Los cocultivos de PBMC con reducción de CD25/VEB-LCL contenían linfocitos T y B que ya expresaban CD86 a un nivel significativamente más elevado que las PBMC no manipuladas y pueden proporcionar coestimulación por sí mismas. La reducción de linfocitos T reguladores CD25+ antes de la activación de los linfocitos T policlonales con anti-CD3 se ha notificado para potenciar la inmunocompetencia del producto de linfocitos T final. Para minimizar el efecto del cultivo in vitro y la expansión de la competencia funcional, se usó un periodo de cultivo relativamente corto en algunos experimentos presentados en la presente memoria, en los cuales, las células se expandieron durante un total de 8 días después de la transducción, realizándose la selección con CD19 el día 4.

Finalmente, se demostró el escalado de la producción de forma que se pudo producir un producto celular suficiente para tratar pacientes adultos a dosis de hasta 10⁷ células/kg: los linfocitos alorreducidos se pueden activar y transducir a 4x10⁷ células por matraz, y se puede obtener un retorno mínimo de 8 veces de producto celular final seleccionado con CD19 el día 8 después de la transducción, para producir al menos 3x10⁸ linfocitos modificados genéticamente alorreducidos por matraz original. El mayor volumen de cultivo se aloja fácilmente en matraces o bolsas adicionales.

La alorreducción y la modificación con iCasp9 presentadas en la presente memoria pueden mejorar significativamente la seguridad de volver a añadir linfocitos T, especialmente después de aloinjertos de citoblastos haploidénticos. Esto, a su vez, debería permitir un escalado de dosis más grande, con una mayor posibilidad de producir un efecto antileucémico.

Ejemplo 3: CASPALLO - Ensayo clínico en Fase I de linfocitos T alorreducidos transducidos con un gen suicida de caspasa-9 inducible después de trasplante de citoblastos haploidénticos

Este ejemplo presenta los resultados de un ensayo clínico en fase 1 usando la estrategia alternativa del gen suicida ilustrado en la Fig. 22. En resumen, células mononucleares de sangre periférica del donante se cultivaron simultáneamente con células linfoblastoides transformadas con el VEB irradiadas del receptor (40:1) durante 72 h, se alorredujeron con una inmunotoxina de CD25 y después se transdujeron con un sobrenadante retrovírico que llevaba el gen suicida iCasp9 y un marcador de selección (Δ CD19); Δ CD19 permitió un enriquecimiento hasta >90 % de pureza mediante selección inmunomagnética, como se ilustra en la Fig. 23.

Se proporciona en la presente memoria un protocolo para generar un producto de terapia celular.

Material fuente

Hasta 240 ml (en 2 extracciones) de sangre periférica se obtuvieron del donante del trasplante según protocolos establecidos. En algunos casos, dependiendo del tamaño del donante y del receptor, se realizó una leucoferesis para aislar linfocitos T suficientes. También se extrajeron 10 cc-30 cc de sangre del receptor, que se usaron para generar la línea de células linfoblastoides transformadas con el virus de Epstein-Barr (VEB) usadas como células estimuladoras. En algunos casos, dependiendo de los antecedentes médicos y/o de la indicación de un recuento de linfocitos B bajo, se generaron LCL usando células mononucleares de sangre periférica de un familiar en primer grado (p. ej., padres, hermanos, o progenie).

Generación de linfocitos alorreducidos

Los linfocitos alorreducidos se generaron a partir de los donantes del trasplante como se indica en la presente memoria. Células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos se cultivaron simultáneamente con líneas celulares linfoblastoides (LCL) transformadas con el virus de Epstein Barr (VEB) en una relación de respondedor a estimulador de 40:1 en medio exento de suero (AIM V; Invitrogen, Carlsbad, CA). Después de 72 horas, los linfocitos T activados que expresaban CD25 se alorredujeron del cultivo simultáneo mediante incubación durante la noche con inmunotoxina RFT5-SMPT-dgA. Se consideró que la alorreducción era correcta si la población residual de CD3⁺CD25⁺ era <1 % y la proliferación residual según la incorporación de ³H-timidina era <10 %.

Producción de retrovirus

Se generó una línea clonal productora de retrovirus para la construcción iCasp9-CD19. También se generó un banco de células maestro del productor. En análisis del banco de células maestro se realizó para excluir la generación de retrovirus competentes para replicación e infección por Mycoplasma, VIH, VHB, VHC, y similares. La línea productora se hizo crecer hasta confluencia, se recogió el sobrenadante, se filtró, se distribuyó en alícuotas y se congeló rápidamente y se almacenó a -80 °C. Se realizaron análisis adicionales sobre todos los lotes de sobrenadante retrovírico para excluir los retrovirus competentes para replicación (RCR) y se emitieron on un certificado de análisis, según indica el protocolo.

Transducción de linfocitos alorreducidos

5 Los linfocitos T alorreducidos se transdujeron con fibronectina. Placas o bolsas se recubrieron con el fragmento de fibronectina recombinante CH-296 (Retronectin™, Takara Shuzo, Otsu, Japón). El virus se unió a la retronectina mediante incubación del sobrenadante productor en placas o bolsas recubiertas. Después, las células se transfirieron a placas o bolsas recubiertas de virus. Después de la transducción, los linfocitos T alorreducidos se expandieron, alimentándolos con IL-2 dos veces a la semana hasta alcanzar el número de células suficiente según el protocolo.

10 Selección inmunomagnética de CD19

15 La selección inmunomagnética de CD19 se realizó 4 días después de la transducción. Las células se marcaron con microperlas magnéticas conjugadas con anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos contra CD19 humano (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) y se seleccionaron en columnas en un dispositivo de selección automatizada CliniMacs Plus (véase la Fig. 24.) Dependiendo del número de células necesarias para la infusión clínica, las células bien se crioconservaron después de la selección con CliniMacs o se expandieron adicionalmente con IL-2 y se crioconservaron el día 6 o el día 8 después de la transducción.

20 Congelación

Se retiraron alícuotas de las células para analizar la eficacia de transducción, la identidad, el fenotipo y el cultivo microbiológico según necesidad para el ensayo de liberación final según la FDA. Las células se crioconservaron antes de su administración según el protocolo.

25 Fármaco del estudio

RFT5-SMPT-dgA

30 RFT5-SMPT-dgA es una IgG1 murina dirigida contra CD25 (cadena alfa del receptor de IL-2) conjugada por medio de un reticulador heterobifuncionalizado [N-succinimidiloxycarbonil-alfa-metil-d-(2-piridiltio)tolueno] (SMPT) a la cadena de ricina A deglicosilada (dgA) químicamente. RFT5-SMPT-dgA se formula como solución estéril a 0,5 mg/ml.

Homodimerizador sintético, AP1903

35 Mecanismo de acción: La muerte celular inducida por AP1903 se consiguió expresando una proteína quimérica que comprende la porción intracelular del receptor humano (proteína caspasa-9), que señala la muerte celular apoptótica, fusionada a un dominio de unión a fármaco derivado de la proteína de unión a FK506 humana (FKBP). Esta proteína quimérica permanece quiescente dentro de las células hasta la administración de AP1903, que reticula los dominios FKBP, iniciando la señalización de la caspasa y la angiogénesis.

40 Toxicología: AP1903 se ha evaluado como Nuevo fármaco en investigación (IND) por la FDA y ha completado satisfactoriamente un estudio clínico de seguridad en fase I. No se observaron efectos adversos significativos cuando se administró AP1903 en un intervalo de dosis de 0,01 mg/kg a 1,0 mg/kg.

45 Farmacología/Farmacocinética: Los pacientes recibieron 0,4 mg/kg de AP1903 como infusión de 2 h basándose en los datos de Pk publicados que muestran concentraciones plasmáticas de 10 ng/ml-1275 ng/ml para el intervalo de dosis de 0,01 mg/kg/kg a 1,0 mg/kg con niveles plasmáticos comprendidos entre el 18 % y el 7 % del máximo a 0,5 y 2 h después de la dosis.

50 Perfil de efectos secundarios en seres humanos: No se produjeron eventos adversos graves durante el estudio en Fase 1 en voluntarios. La incidencia de eventos adversos fue muy baja después de cada tratamiento, siendo los eventos adversos de severidad leve. Solamente se consideró un evento adverso como posiblemente relacionado con AP1903. Se trató de un episodio de vasodilatación, presentado como “enrojecimiento facial” en un voluntario a la dosificación de 1,0 mg/kg de AP1903. Este evento se produjo 3 minutos después de iniciar la infusión y se resolvió después de una duración de 32 minutos. El resto de eventos adversos notificados durante el estudio se consideraron por el investigador como no relacionados o por tener una relación improbable con el fármaco del estudio. Estos eventos incluyeron dolor torácico, síndrome gripal, halitosis, cefalea, dolor en el sitio de la inyección, vasodilatación, aumento de la tos, rinitis, erupción cutánea, hemorragia en las encías y equimosis.

60 Los pacientes que desarrollaron GVHD de grado 1 se trataron con 0,4 mg/kg de AP1903 en infusión de 2 h. Los protocolos para administrar AP1903 a los pacientes con GVHD de grado 1 se establecieron de la siguiente forma. Los pacientes que desarrollaron GvHD tras infusión de linfocitos T alorreducidos se sometieron a biopsia para confirmar el diagnóstico y recibieron 0,4 mg/kg de AP1903 en infusión de 2 h. Los pacientes con GVHD de grado 1 no recibieron inicialmente ningún otro tratamiento, sin embargo, y mostraban progresión de la GvHD, se administró terapia convencional contra la GvHD según las directrices de la institución. Los pacientes que desarrollaron GVHD de grados 2-4 recibieron terapia inmunosupresora sistémica convencional según las directrices de la institución, además del fármaco dimerizador AP1903.

Instrucciones para la preparación y la infusión: AP1903 para inyección se obtuvo en forma de solución concentrada de 2,33 ml en un vial de 3 ml, a una concentración de 5 mg/ml, (es decir, 10,66 mg por vial). Antes de a administración, la dosis calculada se diluyó hasta 100 ml en solución salina normal al 0,9 % para infusión. AP1903 para inyección (0,4 mg/kg) en un volumen de 100 ml se administró mediante infusión IV durante 2 horas, utilizando un conjunto de infusión esterilizado sin DEHP ni óxido de etileno, y una bomba de infusión.

La construcción de expresión del gen suicida iCasp9 (p. ej., SFG.iCasp9.2A.ACD19), mostrado en la Fig. 25, consistía en caspasa-9 inducible (iCasp9) unida, mediante una secuencia análoga a 2A escindible, a CD19 truncado humano (ACD19). iCasp9 incluye una proteína de unión a FK506 humana (FKBP12; GenBank AH002 818) con una mutación F36V, conectada mediante un enlazador Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly a la caspasa-9 humana (CASP9; GenBank NM 001229). La mutación F36V puede aumentar la afinidad de unión de FKBP12 con el homodimerizador sintético, AP20187 o AP1903. El dominio de reclutamiento de la caspasa (CARD) se ha eliminado de la secuencia de la caspasa-9 humana y su función fisiológica se ha sustituido por FKBP12. La sustitución de CARD por FKBP12 aumenta la expresión y la función del transgén. La secuencia análoga a 2A codifica un péptido de 18 aminoácidos del virus de insecto *Thosea* asigna, que media >99 % de la escisión entre una glicina y un resto de prolina del extremo, dando como resultado 17 aminoácidos adicionales en el extremo C de la iCasp9, y un resto de prolina adicional en el extremo N de CD19. ΔCD19 consiste en CD19 de longitud completa (GenBank NM 001770) truncado en el aminoácido 333 (TDPTRRF), que acorta el dominio intracitoplasmático de 242 a 19 aminoácidos, y elimina todos los restos de tirosina conservados que son sitios de fosforilación potenciales. En la Fig. 26 se ilustra el resultado de iCasp9 y AP1903 en la eliminación de los linfocitos T modificados genéticamente que tienen el interruptor suicida iCasp9.

Estudios in vivo

Tres pacientes recibieron linfocitos T iCasp9⁺ T después de un trasplante de citoblastos (SCT) haplo-CD34⁺, a niveles de dosis comprendidos entre aproximadamente 1×10⁶ y aproximadamente 3×10⁶ células/kg.

Tabla 2: Características de los pacientes y resultado clínico.

N.º del paciente	Sexo (edad (años))	Diagnóstico	Patología en la SCT	Días desde la SCT hasta la infusión de linfocitos T	Número de células infundidas por kg	GvHD aguda	Resultado clínico
P1	M(3)	SMD/LMA	CR2	63	1 × 10 ⁶	Grado 1/2 (piel, hígado)	Vivo en CR>12 meses sin GvHD
P2	F(17)	B-LLA	CR2	80 y 112	(1 × 10 ⁶) ²	Grado 1 (piel)	Vivo en CR>12 meses sin GvHD
P3	M(8)	T-LLA	PIF/CR1	93	3 × 10 ⁶	Ninguno	Vivo en CR>12 sin GvHD
P4	F(4)	T-LLA	Enfermedad activa	30	3 × 10 ⁶	Grado 1 (piel)	Vivo en CR>12 sin GvHD

Los linfocitos T infundidos se detectaron in vivo mediante citometría de flujo (CD3⁺ΔCD19⁺) o qPCR incluso a los 7 después de la infusión, con un máximo de veces de expansión de 170±5 (día 29±9 después de la infusión), como se ilustra en las Figs. 27, 28 y 29. Dos pacientes desarrollaron aGVHD de grado I/II (véanse las Figs. 31-32) y la administración de AP1903 produjo >90 % de disminución de linfocitos CD3⁺ΔCD19⁺, en un plazo de 30 minutos de infusión (véanse las Figs. 30, 33 y 34), con una reducción log adicional en un plazo de 24 horas, y resolución de la aGVHD de piel e hígado en un plazo de 24 h (véase la Fig. 35), lo que muestra que el transgén iCasp9 era funcional in vivo.

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 (piel, hígado)
2	124	45/13	2 (piel)

Los experimentos ex vivo confirmaron estos datos. Adicionalmente, los linfocitos T alorreducidos pudieron expandirse y fueron reactivos contra los virus (CMV) y hongos (*Aspergillus fumigatus*) (producción de IFN-γ), como se muestra en las Figs. 36-42. Estos estudios in vivo descubrieron que una sola dosis del fármaco dimerizador puede reducir o eliminar la subpoblación de los linfocitos T que producen GvHD, pero pueden preservar los CTL, que posteriormente pueden volver a expandirse.

Reconstitución inmunitaria

Dependiendo de la disponibilidad de pacientes, células y reactivos, los estudios de reconstitución inmunitaria (inmunofenotipado, función de linfocitos T y linfocitos B) se pueden obtener como intervalos en serie después del trasplante. Se analizarán diversos parámetros que miden la reconstitución inmunitaria resultado de linfocitos T alorreducidos transducidas con iCaspara. El análisis incluye mediciones repetidas del recuentos de linfocitos totales, cantidad de linfocitos T y B CD19, y análisis FACS de los conjuntos 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).
 5 Dependiendo de la disponibilidad de linfocitos T de pacientes, también se analizarán los marcadores de linfocitos T reguladores tales como CD41CD251FoxP3. Se extrajeron aproximadamente 10-60 ml de sangre del paciente, cuando fue posible, 4 horas después de la infusión, semanalmente durante 1 mes, mensualmente \times 9 meses, y después a 1 y 2
 10 años. La cantidad de sangre extraída es dependiente del tamaño del receptor, y no supera en total 1-2 cc/kg (lo que permite sangre extraída para atención médica y evaluación del estudio) para cualquier extracción de sangre individual.

Persistencia y seguridad de linfocitos T alorreducidos

15 El siguiente análisis también se realizó sobre las muestras de sangre periférica: monitorización de la función, persistencia y seguridad de los linfocitos T transducidos en los puntos temporales indicados por el calendario del estudio.
 Fenotipo para detectar la presencia de células transgénicas
 Ensayo de RCR por PCR.
 PCR cuantitativa en tiempo real para detectar integrantes retrovíricos.
 20 El ensayo de RCR por PCR se realizó antes del estudio, a los 3, 6 y 12 meses, y después anualmente durante un total de 15 años. Las muestras de tejido, células y suero se almacenaron para su uso en futuros estudio para RCR según lo indicado por la FDA.

Análisis estadístico y reglas de detención.

25 La MTD se define como la dosis que produce GVHD aguda de grado III/IV en al menos un 25 % de los casos idóneos. La determinación se basa en un método de reevaluación continua modificado (CRM) que utiliza un modelo logístico con una cohorte de tamaño 2. Se encuentran en evaluación tres grupos de dosis, concretamente 1×10^6 , 3×10^6 , 1×10^7 donde las probabilidades de toxicidad previas se estimaron en 10 %, 15 % y 30 %, respectivamente. El diseño CRM propuesto
 30 utiliza modificaciones sobre el CRM original agrupando más de un sujeto en cada cohorte, limitando el aumento de la dosis a no más de un nivel de dosis, e iniciando la inscripción de los paciente para el menor nivel de dosis comprobado como seguro para las células no transducidas. El resultado de toxicidad para la cohorte de dosis menor se utiliza para actualizar la curva de dosis-toxicidad. La siguiente cohorte de pacientes se asigna al nivel de dosis que tiene una probabilidad de toxicidad asociada más cercano a la probabilidad diana del 25 %. Este proceso continúa hasta que al menos 10 pacientes
 35 se han agrupado en este estudio de aumento de la dosis. Dependiendo de la disponibilidad de pacientes, se inscribirán como máximo 18 pacientes en el ensayo clínico en Fase I o hasta que se hayan tratado 6 pacientes en la MTD actual. La MTD final será la dosis que tenga la probabilidad más cercana al índice de toxicidad diana en estos puntos de terminación.

40 Se realizaron simulaciones para determinar las características operativas del diseño propuesto, y estas se compararon con el diseño de aumento de la dosis 3+3 convencional. El diseño propuesto proporciona mejores estimaciones de la MTD basándose en una mayor probabilidad de declarar el niveles de dosis adecuado como la MTD, consiguió un menor número de pacientes incorporados a niveles de dosis menores y por tanto ineficaces, y mantuvo una cantidad baja promedio total de pacientes necesarios para el ensayo clínico. Se espera una curva de dosis-toxicidad bastante plana para el intervalo de dosis propuesto en la presente memoria y, por tanto, se
 45 pueden realizar aumentos de dosis acelerados sin comprender la seguridad del paciente. Las simulaciones realizadas indican que el diseño CRM modificado no incurre en un número grande promedio de toxicidades totales, cuando se compara con el diseño estándar (toxicidades totales igual a 1,9 y 2,1, respectivamente).

50 La GVHD grado III/IV que se produce en un plazo de 45 días desde la infusión inicial de linfocitos T alorreducidos se puede factorizar en los cálculos de CRM para determinar la dosis recomendada para la siguiente cohorte. La monitorización en tiempo real del resultado de toxicidad del paciente se realiza durante el estudio para implementar estimaciones 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 anteriormente especificados.

55 El tratamiento de toxicidades limitantes incluirá reacciones de grado 4 relacionadas con la infusión, fracaso del injerto (definido como un declive posterior en la ANC hasta $<5001 \text{ mm}^3$ para tres mediciones consecutivas en días diferentes, falta de respuesta a la terapia con factor de crecimiento que persiste durante al menos 14 días.) que se produce en un plazo de 30 días después de la infusión de TC-T, eventos adversos de grado 4 no hematológicos y no infecciosos, aparecidos en un plazo de 30 días después de la infusión, GVHD aguda grados 3-4 a 45 días después de la infusión de
 60 TC-T, fallecimientos relacionados con el tratamiento producidos en un plazo de 30 días después de la infusión

Las tasas de GVHD se resumieron usando estadística descriptiva junto con otras medidas de seguridad y toxicidad. Análogamente, se calculará estadística descriptiva para resumir la respuesta clínica y biológica en pacientes que recibieron AP1903 debido a una GVHD de grado superior a 1.

65

Se analizarán diversos parámetros que miden la reconstitución inmunitaria resultado de linfocitos T alorreducidos transducidas con iCaspasa. Esto incluye mediciones repetidas de recuentos de linfocitos totales, cantidad de linfocitos T y B CD19, y análisis FACS de los 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). Si quedan suficientes linfocitos T para el análisis, también se analizarán los marcadores de linfocitos T reguladores tales como CD4/CD25/FoxP3. Se realizarán mediciones de cada sujeto antes de la infusión y en múltiples puntos temporales después de la infusión, como se ha presentado anteriormente.

Se presentarán resúmenes descriptivos de estos parámetros para el grupo de pacientes global y por grupo de dosis, así como por tiempo de medición. Se generarán curvas de crecimiento que presentan mediciones con el tiempo para un paciente para visualizar patrones generales de reconstitución inmunitaria. La proporción de los linfocitos positivos para iCasp9 también se resumirá en cada punto temporal. Se implementarán comparaciones emparejadas de cambios en estos criterios de valoración con el tiempo en comparación con los valores anteriores a la infusión mediante pruebas de la t emparejadas o prueba de rangos con signo de Wilcoxon.

Se realizará el análisis longitudinal de cada parámetro de reconstitución inmunitaria medido repetidamente usando el modelo de coeficientes aleatorios. El análisis longitudinal permite la construcción de patrones modelo de reconstitución inmunitaria según el paciente, permitiendo al mismo tiempo variar las pendientes y ordenadas en el origen para un paciente. También se usará el nivel de dosis como variable independiente del modelo para tener en cuenta los diferentes niveles de dosis recibidos por los pacientes. La prueba de si hay una mejora significativa en la función inmunitaria con el tiempo, y la estimación de la magnitud de estas mejoras dependiendo de las estimaciones de las pendientes y su error estándar será posible usando el modelo presentado en la presente memoria. También se realizará la evaluación de cualquier indicio de diferencias en las tasas de reconstitución inmunitaria entre diferentes niveles de dosis de CTL. En estos modelos se utilizará la distribución normal con un vínculo de identidad, y se implementará con el procedimiento SAS MIXED. La suposición habitual de la normalidad de los parámetros de reconstitución inmunitaria se evaluará y, en caso necesario, se pueden realizar transformaciones (p. ej. log, raíz cuadrada), para conseguir la normalidad.

Se puede utilizar una estrategia similar a la anteriormente presentada para evaluar la cinética de la supervivencia, expansión y persistencia de los linfocitos T. La relación entre la cantidad absoluta de linfocitos T y la cantidad de linfocitos positivos para el gen marcador se determinará y se modelará longitudinalmente con el tiempo. Una estimación positiva de la pendiente indicará la contribución creciente de los linfocitos T en la recuperación inmunitaria. La inmunidad específica de virus de linfocitos T iCasp9 se evaluará mediante el análisis del número de linfocitos T que liberan IFN gamma basándose en la estimulación ex vivo de CTL específicos de virus usando modelos longitudinales. Se generarán modelos independientes para el análisis del VEB, CMV y adenovirus de la inmunidad.

Finalmente, la supervivencia global y exenta de enfermedad en toda la cohorte de pacientes se resumirá usando el método de límite de producto de Kaplan-Meier. La proporción de pacientes supervivientes y los exentos de enfermedad a los 100 días y 1 año después del trasplante se pueden estimar de las curvas de Kaplan-Meier.

En conclusión, la readición de linfocitos T alorreducidos iCasp9+ allodepleted T después del SCT haplo CD34+ permite una expansión significativa de linfocitos T del donante funcionales in vivo y un aclaramiento rápido de linfocitos T alorreactivos con resolución de aGvHD.

Ejemplo 4: Alorreducción de linfocitos T in vivo

Los protocolos proporcionados en los Ejemplos 1-3 también se pueden modificar para proporcionar la alorreducción de linfocitos T in vivo. Para ampliar el enfoque a un grupo más grande de sujetos que se podrían beneficiar de la reconstitución inmunitaria sin GvHD aguda, el protocolo se puede simplificar, proporcionando un método in vivo para la reducción de linfocitos T. El método de pretratamiento de alorreducción, que se analiza en la presente memoria, líneas celulares linfoblastoides transformadas con el VEB se prepararon en primer lugar a partir del receptor, que después actúan como células presentadoras de aloantígenos. Este procedimiento puede tardar hasta 8 semanas, y puede fracasar en sujetos ampliamente pretratados con neoplasias malignas, especialmente si han recibido rituximab como uno de los componentes de su terapia inicial. Posteriormente, linfocitos T de donantes se cultivan simultáneamente con VEB-LCL del receptor, y los linfocitos T alorreactivos (que expresan el antígeno de activación CD25) se tratan después con un anticuerpo monoclonal conjugado con CD25-ricina. Este procedimiento puede requerir varios días más de trabajo de laboratorio para cada sujeto.

El proceso se puede simplificar usando un método in vivo de alorreducción, construido sobre la rápida reducción observadas in vivo de los linfocitos T alorreactivos mediante el fármaco dimerizador y la preservación de los linfocitos T no estimulados pero reactivos a virus/hongos.

Si se produce un desarrollo de GvHD aguda de Grado I o superior, una sola dosis del fármaco dimerizador se administra, por ejemplo, a una dosis de 0,4 mg/kg de AP1903 en forma de infusión intravenosa de 2 horas. Se pueden administrar hasta 3 dosis adicionales del fármaco dimerizador en intervalos de 48 horas, si persiste la GvHD aguda. En sujetos con GvHD aguda de Grado II o superior, estas dosis adicionales del fármaco dimerizador se pueden combinar con esteroides. Para los pacientes con GVHD persistente que no pueden recibir

dosis adicionales del dimerizador debido a una reacción de Grado III o IV al dimerizador, el paciente se puede tratar solamente con esteroides, después de bien 0 o 1 dosis del dimerizador.

5 Generación de linfocitos T terapéuticos

Hasta 240 ml (en 2 extracciones) de sangre periférica se obtienen del donante del trasplante según el consentimiento de recogida. Si es necesario, se utiliza leucoferesis para obtener suficientes linfocitos T; (bien antes de la movilización de citoblastos o varios días después de la última dosis de G-CSF). También se recogieron 10-30 ml de sangre adicionales para analizar enfermedades infecciosas, tales como hepatitis y VIH.

10 La células mononucleares de sangre periférica se activaron usando un anticuerpo dirigido contra CD3 humano (p. ej. de Orthotech o Miltenyi) el día 0 y se expandieron en presencia de interleucina 2 recombinante humana (rhIL-2) en el día 2. Los linfocitos T activados con el anticuerpo de CD3 se transdujeron mediante el vector retrovítico icaspasa-9 en matraces o placas recubiertas con el fragmento de fibronectina recombinante CH-296 (Retronectin™, Takara Shuzo, Otsu, Japón). El virus se unió a la retronectina mediante incubación del sobrenadante productor en placas o bolsas recubiertas con retronectina. Después, las células se transfirieron a dispositivos de cultivo de tejido recubiertos con virus. Después de la transducción, los linfocitos T se expandieron alimentándolos con rhIL-2 dos veces a la semana hasta alcanzar el número de células suficiente según el protocolo.

15 Para garantizar que la mayoría de linfocitos T infundidos llevaban el gen suicida, se puede usar un marcador seleccionable, CD19 truncado humano (Δ CD19) y un dispositivo de selección comercial para seleccionar la células transducidas hasta >90 % de pureza. La selección inmunomagnética de CD19 se puede realizar 4 días después de la transducción. Las células se marcaron con microperlas magnéticas conjugadas con anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos contra CD19 humano (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) y se seleccionaron en columnas en un dispositivo de selección automatizada CliniMacs Plus. Dependiendo del número de células necesarias para la infusión clínica, las células podrían bien crioconservarse después de la selección con CliniMacs o expandirse adicionalmente con IL-2 y crioconservarse en cuanto se hubiera expandido suficiente cantidad de células (hasta el día 14 desde el inicio de la producción).

20 Se pueden extraer alícuotas de las células para analizar la eficacia de transducción, la identidad, el fenotipo, el crecimiento autónomo y exploración microbiológica según necesidad para el ensayo de liberación final según la FDA. Las células se van a crioconservar antes de la administración.

25 Administración de linfocitos T

30 Los linfocitos T transducidos se administraron a los pacientes a partir de, por ejemplo, entre 30 y 120 días después del trasplante de citoblastos. Los linfocitos T crioconservados se descongelaron y se infundieron a través de una línea de catéter con solución salina normal. Para los niños, las premedicaciones se ponderaron según el peso. Las dosis de células pueden estar comprendidas, por ejemplo, de aproximadamente 1×10^4 células/kg a 1×10^8 células/kg, por ejemplo de aproximadamente 1×10^5 células/kg a 1×10^7 células/kg, de aproximadamente 1×10^6 células/kg a 5×10^8 células/kg, de aproximadamente 1×10^4 células/kg a 5×10^6 células/kg, por ejemplo, aproximadamente 1×10^4 , aproximadamente 1×10^5 , aproximadamente 2×10^5 , aproximadamente 3×10^5 , aproximadamente 5×10^5 , 6×10^5 , aproximadamente 7×10^5 , aproximadamente 8×10^5 , aproximadamente 9×10^5 , aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente 2×10^6 , aproximadamente 3×10^6 , aproximadamente 4×10^6 , o aproximadamente 5×10^6 células/kg.

35 Tratamiento de la GvHD

Los pacientes que desarrollaron GVHD aguda de grado ≥ 1 se trataron con 0,4 mg/kg de AP1903 en infusión de 2 horas. AP1903 para inyección se puede proporcionar, por ejemplo, en forma de solución concentrada de 2,33 ml en un vial de 3 ml, a una concentración de 5 mg/ml, (es decir, 10,66 mg por vial). Antes de a administración, la dosis calculada se diluirá hasta 100 ml en solución salina normal al 0,9 % para infusión. AP1903 para inyección (0,4 mg/kg) en un volumen de 100 ml se puede administrar mediante infusión IV durante 2 horas, utilizando un conjunto de infusión esterilizado sin DEHP ni óxido de etileno, y una bomba de infusión.

55 Tabla 4: Pauta posológica de la muestra

Tiempo	Donante	Receptor
Pretrasplante	Obtener hasta 240 ml de sangre o leucoferesis no estimulada del trasplante de médula ósea. Preparar los linfocitos T y los LCL del donante para estudios de reconstitución inmunitaria posteriores.	
Día 0	Activación con anti-CD3 de	

	PBMC	
Día 2	Alimentación con IL-2	
Día 3	Transducción	
Día 4	Expansión	
Día 6	Selección con CD19. Crioconservación (*si se satisface la dosis requerida)	
Día 8	Evaluar la eficacia de la transducción y la funcionalidad del gen de la iCaspasa9 según el fenotipo. Crioconservación (*si no se ha realizado ya)	
Día 10 o Día 12 a Día 14	Crioconservación (si no se ha realizado ya)	
De 30 a 120 días después del trasplante		Descongelar e infundir los linfocitos T de 30 a 120 días después de la infusión de citoblastos.

Se pueden seguir otros métodos para terapia clínica y evaluación tales como los que se proporcionan en, por ejemplo, los Ejemplos 1-3 de la presente memoria.

5 Ejemplo 5: Uso del gen suicida iCasp9 para mejorar la seguridad de las terapias con células del estroma mesenquimal

Las células del estroma mesenquimal (MSC) se han infundido a cientos de pacientes hasta la fecha con mínimos efectos adversos notificados. Los efectos secundarios a largo plazo son desconocidos debido al escaso seguimiento y al tiempo relativamente corto transcurrido desde que las MSC se utilizan en el tratamiento de enfermedades. Algunos modelos animales han indicado que existe el potencial de efectos secundarios y, por tanto, sería terapéuticamente deseable un sistema que permitiera el control del crecimiento y la supervivencia de las MSC. La construcción de expresión con el interruptor suicida de caspasa-9 inducible presentada en la presente memoria se investigó como método de eliminar las MSC in vitro e in vivo.

15 Materiales y métodos

Aislamiento de MSC

Las MSC se aislaron de donantes sanos. En resumen, bolsas y filtros de recogida de médula ósea de donantes sanos descartadas después de la infusión se lavaron con RPMI 1640 (HyClone, Logan, UT) y se sembraron en frascos de cultivo tisular en DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) con suero de feto bovino al 10 % (FBS), alanil-glutamina 2 mM (Glutamax, Invitrogen), 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (Invitrogen). Después de 48 horas, el sobrenadante se descartó y las células se cultivaron en medio de cultivo completo (CCM): α-MEM (Invitrogen) con FBS al 16,5 %, BS, alanil-glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Las células se hicieron crecer hasta menos del 80 % de confluencia y se volvieron a sembrar a densidades menores según sea adecuado.

Inmunofenotipado

Para teñir las MSC, se usaron anticuerpos monoclonales de CD14, CD34, CD45, CD73, CD90, CD105 y CD133 conjugados con ficoeritrina (PE), isotiocianato de fluoresceína (FITC), proteína peridina clorofila (PerCP) o alofocianina (APC). Todos los anticuerpos eran de Becton Dickinson-Pharmingen (San Diego, CA), salvo donde se indique. En cada experimento se incluyeron muestras de control marcadas con un anticuerpo adecuado de isotipo coincidente. Las células se analizaron mediante clasificación celular activada por fluorescencia FACScan (Becton Dickinson) provisto con un conjunto de filtros para 4 señales fluorescentes.

35 Estudios de diferenciación in vitro

Diferenciación de adipocitos. Las MSC ($7,5 \times 10^4$ células) se sembraron en los pocillos de una placa 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 Oil Red O (obtenida al diluir Oil Red O al 0,5 % p/v en isopropanol con agua en una relación 3:2), tras fijación con formaldehído al 4 % en suero salino tamponado con fosfato (PBS).

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

Diferenciación condroblástica. Los aglomerados de MSC que contenían de $2,5 \times 10^5$ a 5×10^5 células se obtuvieron mediante centrifugación en tubos cónicos de polipropileno de 15 ml o 1,5 ml y se cultivaron en medio NH ChondroDiff (Miltenyi Biotech). El medio se cambió cada tres días durante un total de 24 días. Los aglomerados celulares se fijaron en formalina al 4 % en PBS y se procesaron mediante corte en parafina rutinario. Los cortes se tiñeron con azul alcian o usando inmunofluorescencia indirecta para el colágeno de tipo II (anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra el colágeno de tipo II MAB8887, Millipore, Billerica, MA) después de la recuperación del antígeno con pepsina (Thermo Scientific, Fremont, CA).

Producción diCasp9- Δ CD19 y transducción de las MSC

El retrovirus SFG.iCasp9.2A. Δ CD19 (iCasp9- Δ CD19) consiste de iCasp9 unida, mediante una secuencia análoga a 2A escindible, a CD19 truncado humano (Δ CD19). 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 mediante un enlazador Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly a la caspasa-9 humana, cuyo dominio de reclutamiento (CARD) se ha eliminado, y su función se ha sustituido por FKBP12.

La secuencia análoga a 2A codifica un péptido de 20 aminoácidos del virus de insecto *Thosea Asigna*, que media más del 99 % de la escisión entre una glicina y un resto prolina del extremo, para garantizar la separación entre iCasp9 y Δ CD19 después de la traducción. Δ CD19 consiste en CD19 humano truncado en el aminoácido 333, que elimina todos los restos de tirosina intracitoplásmica conservados que son sitios de fosforilación potenciales. Un clon PG13 productor del retrovirus de la leucemia de gibón (Gal-V) pseudotipado se preparó transfectando transitoriamente la línea celular Phoenix Eco (producto ATCC n.º SD3444; ATCC, Manassas, VA) con SFG.iCasp9.2A. Δ CD19, que produjo el retrovirus con pseudotipado Eco. La línea celular de empaquetamiento PG13 (ATCC) se transdujo 3 veces con retrovirus Eco-pseudotipado para generar una línea productora que contenía múltiples integrantes SFG.iCasp9.2A. Δ CD19 províricos por célula. Se realizó la clonación de una sola célula, y el clon PG13 que produjo el título más alto se expandió y se utilizó para la producción del vector. El sobrenadante retrovírico se obtuvo mediante el cultivo de la línea de células productoras en IMDM (Invitrogen) con FBS al 10 %, alanil-glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomina. El sobrenadante que contenía el retrovirus se recogió 48 y 72 horas después del cultivo inicial. Para la transducción, aproximadamente 2×10^4 MSC/cm² se sembraron en CM en placas de 6 pocillos, matraces T75 o T175. Después de 24 horas, el medio se sustituyó por el sobrenadante vírico diluido 10 veces junto con polibreno (concentración final 5 μ g/ml) y las células se incubaron a 37 °C en CO₂ al 5 % durante 48 horas, después de lo cual, las células se mantuvieron en medio completo.

Enriquecimiento celular

Para la selección de MSC positivas para iCasp9- Δ CD19 inducible para los experimentos in vitro, las MSC transducidas retrovíricamente se enriquecieron en células positivas para 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 de CD19 conjugado con PE o APC (clon SJ25C1) para evaluar la pureza de las fracciones celulares.

Estudios de apoptosis in vitro

MSC no diferenciadas. El inductor de la dimerización químico (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 lo cual, las células se recogieron y se tiñeron con anexina V-PE y 7-AAD tampón de unión a anexina V (BD Biosciences, San Diego, CA). Las MSC transducidas con iCasp9 de control se mantuvieron en cultivo sin exposición a CID.

MSC diferenciadas. Las MSC transducidas se diferenciaron como se ha presentado anteriormente. Al finalizar el periodo de diferenciación, se añadió CID al medio de diferenciación a 50 nM. Las células se tiñeron adecuadamente para el tejido a estudiar, como se ha presentado anteriormente, y se usó tinción de contraste (azul de metileno o azul de metileno) para evaluar la morfología nuclear y citoplásmica. En paralelo, los tejidos se procesaron para un ensayo de marcado de final de corte de dUTP de desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL) según las instrucciones del fabricante (kit de detección In Situ Cell Death, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Para cada punto temporal, se fotografiaron cuatro campos aleatorios a una ampliación final de 40x y las imágenes se analizaron con el software ImageJ versión 1.43o (NIH, Bethesda, MD). La densidad celular se calculó como número de núcleos (positividad para DAPI) por unidad de superficie específica (en mm²). El porcentaje de células apoptóticas se determinó como la relación entre el número de núcleos con una señal TUNEL positiva (positividad para FITC) y el número de núcleos totales. Los controles se mantuvieron en cultivo sin CID.

Estudios de destrucción in vivo en un modelo murino

Todos los experimentos con ratones se realizaron según las directrices de crianza animal del Baylor College of Medicine. Para evaluar la persistencia de las MSC modificadas in vivo, se usó el modelo de ratón SCID junto con un sistema de obtención de imágenes in vivo. Las MSC se transdujeron con retrovirus que codificaban el gen potenciado de la proteína fluorescente verde-luciferasa de luciérnaga (eGFP-FFLuc) solo o junto con el gen iCasp9-

ΔCD19. Las células se clasificaron para determinar la positividad eGFP mediante clasificación celular activada por fluorescencia usando un citómetro de flujo MoFlo (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Las células transducidas doblemente también se tiñeron con anti-CD19 conjugado con PE y se clasificaron para determinar la positividad para PE. Ratones SCID (8-10 semanas de edad) recibieron por vía subcutánea 5×10^5 MSC con y sin iCasp9-ΔCD19 en flancos opuestos. Los ratones recibieron dos inyecciones intraperitoneales de 50 μg de CID 24 horas de separación partiendo una semana después. Para la obtención de imágenes in vivo de las MSC que expresan eGFP-FFLuc, los ratones recibieron una inyección por vía intraperitoneal de D-luciferina (150 mg/kg) y se analizaron usando el sistema de obtención de imágenes Xenogen-IVIS. La luminiscencia total (una medición proporcional al total de MSC depositadas) en cada punto temporal se calculó definiendo automáticamente regiones de interés (ROI) en los sitios de implante de MSC. Estas ROI incluyen todas las áreas con señales luminiscentes al menos un 5 % por encima del fondo. Los recuentos de fotones totales se integraron para cada ROI a un valor promedio calculado. Los resultados de normalizaron de forma que el tiempo cero corresponda a un 100 % de la señal.

En un segundo conjunto de experimentos, una mezcla de $2,5 \times 10^6$ MSC marcadas con eGFP-FFLuc y $2,5 \times 10^6$ MSC transducidas con iCasp9-ΔCD19 marcadas con eGFP-FFLuc se inyectaron por vía subcutánea en el flanco derecho, y los ratones recibieron dos inyecciones intraperitoneales de 50 μg de CID separadas 24 h desde 7 días después. En diversos puntos temporales tras la inyección de CID, los aglomerados subcutáneos de MSC se recogieron utilizando técnicas de luminiscencia tisular para identificar y recoger el espécimen humano completo y minimizar la contaminación con tejido de ratón. A continuación, el ADN genómico se aisló usando miniADN QIAmp® (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 específicos y sondas (para la construcción eGFP-FFLuc: cebador directo 5'-TCCGCCCTGAGCAAAGAC-3', cebador inverso 5'-ACGAACTCCAGCAGGACCAT-3', sonda 5' FAM, 6-carboxifluoresceína-ACGAGAAGCGCGATC-3' MGBNFQ, inactivador no fluorescente unido al surco menor; iCasp9-ΔCD19: directo 5'-CTGGAATCTGGCGGTGGAT-3', inverso 5'-CAAACCTCTCAAGAGCACCGACAT-3', sonda 5' FAM-CGGAGTCGACGGATT-3' MGBNFQ). Se usaron cantidades conocidas de plásmidos que contenían copias únicas de cada transgén para establecer curvas patrón. Se determinó que aproximadamente 100 ng de ADN aislado de poblaciones "puras" de MSC transducidas con solo con eGFP-FFLuc doblemente con eGFP-FFLuc y iCasp9 tuvieron cantidades similares de copias del gen eGFP-FFLuc (aproximadamente $3,0 \times 10^4$), así como cero y $1,7 \times 10^3$ copias del gen iCasp9-ΔCD19, respectivamente.

Las células humanas no transducidas y los tejidos de ratón tuvieron cero copias de ambos genes en 100 ng de ADN genómico. Puesto que el número de copias del gen eGFP es el mismo en cantidades idénticas del ADN aislado a partir de cualquier población de MSC (negativas o positivas para iCasp9), el número de copias de este gen en ADN aislado de cualquier mezcla de células será proporcional al número total de células positivas para eGFP-FFLuc (MSC positivas para iCasp9 junto con MSC negativas). Además, puesto que los tejidos negativos para iCasp9 no contribuyen al número de copias de iCasp9, el número de copias del gen de iCasp9, en cualquier muestra será proporcional al número total de células positivas para iCasp9. Por lo tanto, si G es el número total de células positivas para GFP y negativas para iCasp9 y C es el número total de células positivos para GFP y positivas para iCasp9, para cualquier muestra de ADN, entonces $N_{eGFP} = g \cdot (C+G)$ y $N_{iCasp9} = k \cdot C$, donde N representa el número de copias del gen y g y k son constantes relativas al número de copias y al número de células para los genes eGFP e iCasp9, respectivamente. Así, $N_{iCasp9}/N_{eGFP} = (k/g) \cdot [C/(C+G)]$, 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 para iCasp9) entre todas las células positivas para eGFP. Aunque los valores absolutos de N_{iCasp9} y N_{eGFP} disminuirán al aumentar la contaminación por células murinas en cada explante de MSC, en cada punto temporal la proporción será constante independientemente de la cantidad de tejido murino incluido, puesto que ambos tipos de células humanas está físicamente mezcladas. Suponiendo tasas similares de apoptosis espontánea en ambas poblaciones (como se ha documentado mediante cultivo in vitro), el cociente entre N_{iCasp9}/N_{eGFP} en cualquier punto temporal y el valor a tiempo cero representa el porcentaje de células supervivientes positivas para iCasp9 tras la exposición a CID. Todas las determinaciones del número de copias se realizaron por triplicado.

Análisis estadístico

Se usó la prueba de la t de Student emparejada bilateral para determinar la significación estadística de las diferencias entre muestras. Todos los datos numéricos representados son media \pm 1 desviación estándar.

Resultados

Las MSC se transduce fácil con iCasp9-ΔCD19 y mantienen su fenotipo básico

El análisis de citometría de flujo de las MSC procedentes de 3 donantes sanos mostraron que eran uniformemente positivas para CD73, CD90 y CD105 y negativas para los marcadores hematopoyéticos CD45, CD14, CD133 (Fig. 15A) y CD34. La fracción adherente mononuclear aislada de médula ósea era positiva homogéneamente para CD73, CD90 y CD105 y negativa para marcadores hematopoyéticos. La diferenciación potencial de las MSC aisladas en adipocitos, osteoblastos y condroblastos se confirmó en ensayos específicos (véase la Fig. 15B), lo que demuestra que estas células eran MSC *bona fide*. La Fig. 15B ilustra los resultados de los estudios de diferenciación, las MSC aisladas pudieron diferenciarse en adipocitos (izquierda, rojo aceite y azul de metileno), osteoblastos (centro, fosfatasa alcalina-fosfato de bromocloroindolilo/azul de nitrotetrazolio y azul de metileno) y condroblastos (derecha, anticuerpo dirigido contra colágeno de tipo II-rojo Texas y DAPI) cuando se cultivaron en el medio adecuado.

Las MSC de paso temprano se transdujeron con un vector retroviral iCasp9- Δ CD19 que codificaba una forma inducible de la caspasa-9. En condiciones de transducción individual óptima, un 47 ± 6 % de las células expresaban CD19, una forma truncada de la cual se transcribe en cis con iCasp9, sirviendo como medida derivada para una transducción correcta y permitir la selección de células transducidas. El porcentaje de células positivas para CD19 fue estable para más de dos células en el cultivo, lo que sugiere que no hay efectos perjudiciales o ventajosos sobre el crecimiento de la construcción en el MSC, como se muestra en la Fig. 16A. La Fig. 9A ilustra los resultados de las MSC que se sometieron a una sola ronda de transducción con retrovirus iCasp9- Δ CD19. El porcentaje de células positivas para CD19, un indicador de la transducción con iCasp9, permanece constante durante más de 2 semanas. Para abordar además la estabilidad de la construcción, una población de células positivas para iCasp9 purificada mediante un clasificador celular activado por fluorescencia (FACS) se mantuvo en cultivo: no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células positivas para CD19 durante un plazo de seis semanas ($96,5 \pm 1,1$ % al inicio versus $97,4 \pm 0,8$ % después de 43 días, $P = 0,46$). El fenotipo de las células positivas para iCasp9-CD19 fue por otra parte prácticamente idéntico al de las células no transducidas, por tanto, virtualmente todas las células son positivas para CD73, CD90 y CD105 y negativas para los marcadores hematopoyéticos, como se ilustra en la Fig. 16B), confirmando que la manipulación genética de las MSC no modificó sus características básicas.

Las MSC transducidas con iCasp9- Δ CD19 experimentan apoptosis selectiva tras exposición a CID in vitro

El producto génico proapoptótico iCasp9 puede activarse mediante un inductor de la dimerización químico (CID) pequeño, AP20187, un análogo de tacrolimus que se une al dominio de unión a FK506 presente en el producto iCasp9. Las MSC no transducidas tienen una tasa de apoptosis espontánea en cultivo de aproximadamente un 18 % (± 7 %) como las células positivas para iCasp9 al principio (15 ± 6 %, $P = 0,47$). La adición de CID (50 nM) a los cultivos de MSC después de la transducción con iCasp9- Δ CD19 da como resultado la muerte apoptótica de más del 90 % de las células positivas para iCasp9 en un plazo de 24 h (93 ± 1 %, $P < 0,0001$), mientras que las células negativas para iCasp9 retienen un índice de apoptosis similar al de los controles no transducidos (20 ± 7 %, $P = 0,99$ y $P = 0,69$ vs. controles no transducidos con o sin CID respectivamente) (véanse las Figs. 17A y 70B). Después de transducir las MSC con iCasp9, se añadió el inductor de la dimerización químico (CID) a 50 nM a los cultivos en medio completo. La apoptosis se evaluó 24 horas después mediante análisis FACS, después de lo cual, las células se recogieron y se tiñeron con anexina V-PE y 7-AAD. Un noventa y tres por ciento de las células positivas para iCasp9-CD19 (iCasp pos/CID) se convirtieron en positivas para anexina versus solo 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 las células positivas para iCasp9-CD19 no expuestas al CID (iCasp pos/no CID, 13 %), y similar a la tasa apoptótica inicial de las MSC no transducidas (Control/no CID, 16 %). La inmunoselección magnética de las células positivas para iCasp9-CD19 se puede conseguir hasta un alto grado de pureza. Más del 95 % de las células seleccionadas se convirtió en apoptótica tras exposición a CID.

El análisis de una población positiva para iCasp9 altamente purificadas en puntos temporales posteriores después de una sola exposición a CID muestra que la pequeña fracción de células negativas para iCasp9 se expande y que una población de células positivas para iCasp9 permanece, pero que esta última se destruye con una exposición a CID adicional. Así, no se detectó una población positiva para iCasp9 resistente a destrucción posterior mediante el CID (véase la Fig. 18). Una población de MSC negativas para iCasp9-CD19 apareció incluso a las 24 horas después de introducir el CID. Se esperaba una población de MSC negativas para iCasp9-CD19 puesto que conseguir una población con el 100 % de pureza no es realista, y porque las MSC se estaban cultivando en condiciones que favorecían su rápida expansión in vitro. Una fracción de población positiva para iCasp9-CD19 persiste, como se predice por el hecho de que la destrucción con es eficaz al 100 % (suponiendo, por ejemplo, destrucción del 99 % para una población 99 % pura, la población resultante tendría un 49,7 % de células positivas para iCasp9 y un 50,3 % de células negativas para iCasp9). Las células supervivientes, sin embargo, se pueden destruir en un punto temporal posterior mediante una exposición a CID adicional.

Las MSC transducidas con iCasp9- Δ CD19 mantienen el potencial de diferenciación de las MSC no modificadas y su progenie se destruye por exposición a CID

Para determinar si el CID puede destruir selectivamente la progenie diferenciada de las MSC positivas para iCasp9, se usó la inmunoselección magnética con CD19 para aumentar la pureza de la población modificada (>90 % después de una ronda de selección, véase la Fig. 16B). Las células positivas para iCasp9 así seleccionadas se pudieron diferenciar in vivo en todos los linajes de tejido conjuntivo estudiados (véanse las Figs. 19A-19Q). Las MSC humanas se seleccionaron inmunomagnéticamente para determinar la expresión de CD19 (por lo tanto, iCasp9) con una pureza mayor de 91 %. Tras cultivar en medio de diferenciación específico, las células positivas para iCasp9 pudieron dar lugar a linajes adipocíticos (A, aceite rojo y azul de metileno), osteoblásticos (B, fosfatasa alcalina-BCIP/NBT y azul de metileno) y condroblásticos (C, azul alcian y rojo nuclear). Estos tejidos diferenciados se impulsan mediante apoptosis por exposición a CID 50 nM (D-N). Destacar numerosos cuerpos apoptóticos (flechas), burbujas en la membrana citoplásmica (inserción) y pérdida de la arquitectura celular (D y E); amplia positividad TUNEL en nódulos condrocíticos (F-H), y en cultivo adipogénicos (I-K) y osteogénicos (L-N), a diferencia de lo observado en los controles transducidos con iCasp9 no tratados (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 a 50 nM, se observó evidencia microscópica de apoptosis con burbujas en la membrana, acortamiento celular y desprendimiento, y presencia de cuerpos apoptóticos en la totalidad de los cultivos adipogénicos y osteogénicos. Un ensayo TUNEL mostró amplia positividad en los cultivos adipogénicos y osteogénicos y los nódulos condrocíticos (véanse las Figs. 19A-19Q), que aumentaron con el tiempo (véase la Fig. 20). Tras cultivo en medio de diferenciación de adipocitos, las células positivas para iCasp9 produjeron adipocitos. Tras exposición a CID 50 nM, se observó una apoptosis progresiva como se pone de manifiesto por un aumento en la proporción de células positivas para TUNEL. Tras 24 horas, se produjo una disminución significativa en la densidad celular (desde 584 células/mm² a <14 células/mm²), donde prácticamente todas las células apoptóticas se habían desprendido de los portales, impidiendo un posterior cálculo fiable adicional de las células apoptóticas. Así, iCasp9 permaneció funcional incluso después de la diferenciación de las MSC, y su activación da como resultado la muerte de la progenie diferenciada.

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

Aunque las MSC inyectadas por vía intravenosa ya parecen tener un tiempo de supervivencia in vivo corto, las células inyectadas localmente pueden sobrevivir más tiempo y producir, en correspondencia, efectos adversos más intensos. Para evaluar la funcionalidad in vivo del sistema suicida iCasp9 en dicho escenario, ratones SCID recibieron una inyección subcutánea de MSC. Las MSC se transdujeron doblemente con los genes eGFP-FFLuc (anteriormente presentados) e iCasp9-ΔCD19. Las MSC también se transdujeron de forma única con eGFP-FFLuc. Las fracciones positivas para eGFP (y positivas para CD19, donde sea aplicable) se aislaron mediante clasificación celular activada por fluorescencia, con una pureza >95 %. Cada animal recibió una inyección subcutánea de MSC positivas para iCasp9 y MSC de control (ambas positivas para eGFP-FFLuc) en flancos opuestos. La ubicación de las MSC se evaluó usando el sistema de obtención de imágenes Xenogen-IVIS. En otro conjunto de experimentos, una mezcla 1:1 de MSC transducidas de forma simple y doble se inyectaron por vía subcutánea en el flanco derecho, y los ratones recibieron CID como anteriormente. El aglomerado subcutáneo de las MSC se recogió en diferentes puntos temporales, se aisló el ADN genómico, y se usó la qPCR para determinar el número de copias de los genes eGFP-FFLuc e iCasp9-ΔCD19. En estas condiciones, la proporción entre el número de copias de iCasp9 y eGFP es proporcional a la fracción de células positivas para iCasp9 entre las células humanas totales (véase la sección de Métodos anterior para más detalles). Las proporciones se normalizaron de forma que el tiempo cero corresponde al 100 % de células positivas para iCasp9. La exploración en serie de los análisis tras la inoculación subcutánea de las MSC (antes de la inyección de CID) muestra evidencias de apoptosis espontánea en ambas poblaciones de células (como se demuestra por una disminución en la señal de luminiscencia global hasta ~20 % del valor inicial). Esto se había observado anteriormente tras administración sistémica y local de MSC en modelos xenogénicos.

Los datos de luminiscencia mostraron una pérdida sustancial de MSC humanas durante las primeras 96 h (véase la Fig. 21C) tras administración local de las MSC, incluso antes de la administración de CID, sobreviviendo solo aproximadamente 20 % de las células después de una semana. A partir de ese punto temporal en adelante, se produjeron diferencias significativas entre la supervivencia de las MSC positivas para iCasp9 con y sin el fármaco dimerizador. Setenta días después del implante de MSC, se administraron a los animales dos inyecciones de 50 μg de CID separadas 24 horas. Como se ilustra en la Fig. 21A, las MSC transducidas con iCasp9 se destruyeron rápidamente con el fármaco, como se demuestra por la desaparición de su señal luminiscente. Las células negativas para iCasp9 no se vieron afectadas por el fármaco. Los animales que no recibieron el fármaco mostraron persistencia de la señal en ambas poblaciones hasta un mes después del implante de MSC. Para cuantificar además la destrucción celular, se desarrollaron ensayos de qPCR para medir el número de copias de los genes eGFP-FFLuc e iCasp9-ΔCD19. Los ratones recibieron una inyección subcutánea de una mezcla 1:1 de MSC transducidas de forma simple y doble y recibieron CID como anteriormente, una semana después de implantar las MSC. Los explantes de MSC se recogieron en varios puntos temporales, el ADN genómico se aisló de las muestras, y se realizaron ensayos de qPCR sobre cantidades sustancialmente idénticas de ADN. En estas condiciones (véanse los Métodos), para cualquier punto temporal, la proporción entre el número de copias de iCasp9-ΔCD19 a eGFP-FFLuc es proporcional a la fracción de células positivas para iCasp9 viables. Se observó la destrucción progresiva de las células positivas para iCasp9 (>99 %) de forma que la proporción de células positivas para iCasp9 supervivientes se redujo a 0,7 % de la población original después de una semana (véase la Fig. 21B). Por lo tanto, las MSC transducidas con iCasp9 se pueden destruir selectivamente in vivo tras exposición a CID, pero de lo contrario, persisten.

Discusión

La factibilidad de diseñar mediante ingeniería genética MSC humanas para expresar un mecanismo de seguridad usando una proteína suicida inducible se demuestra en la presente memoria. Los datos presentados en la presente memoria muestran que las MSC se pueden transducir fácilmente con el gen suicida iCasp9 acoplado al marcador superficial seleccionable CD19. La expresión de los genes cotransducidos es estable tanto en las MSC como en su progenie diferenciada, y no pone de manifiesto alteraciones en su fenotipo o en su potencial de diferenciación. Estas células transducidas se pueden destruir in vitro e in vivo cuando se exponen al inductor de la dimerización químico de molécula pequeña adecuado que se une a iCasp9.

Para que una terapia basada en células tenga éxito, las células trasplantadas deben sobrevivir al periodo comprendido entre su cosecha y su aplicación clínica in vivo definitiva. Adicionalmente, una terapia basada en células segura también deberá incluir la capacidad de controlar el crecimiento y la actividad no deseados de las células correctamente

trasplantadas. Aunque las MSC se han administrado a muchos pacientes sin notables efectos secundarios, los informes recientes indican protecciones adicionales, tales como el interruptor de seguridad presentado en la presente memoria, puede ofrecer métodos adicionales de control de las terapias basadas en células ya que el potencial de las MSC trasplantadas para modificarse tanto genética como epigenéticamente para potenciar su funcionalidad, y para diferenciarse en linajes incluidos los de hueso y cartílago se investiga y aprovecha adicionalmente. Los sujetos que reciben MSCq que se han modificado genéticamente para liberar proteínas biológicamente activas deberían beneficiarse especialmente de la seguridad adicional proporcionada por un gen suicida.

El sistema suicida presentado en la presente memoria ofrece varias ventajas potenciales sobre otros sistemas suicidas conocidos. Las estrategias que implican análogos de nucleósidos, tales como las que combinan timidina quinasa del virus del herpes simple (HSV-tk) con ganciclovir (GCV) y citosina desaminasa bacteriana o fúngica (CD) con 5-fluorocitosina (5-FC), son dependientes del ciclo celular y es improbable que sean eficaces en tejidos postmitóticos que se puedan formar 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, y una porción significativa del injerto puede sobrevivir y permanecer disfuncional. En algunos casos, los profármacos necesarios para el suicidio tienen por sí mismos usos terapéuticos que quedan por tanto excluidos (p. ej., GCV), o pueden ser tóxicos (p. ej., 5-FC), bien como resultado de su metabolismo por órganos no diana (p. ej., muchos sustratos del citocromo P450), o debido a la difusión a los tejidos vecinos después de la activación con células diana (p. ej., CB1954, un sustrato de la nitrorreductasa bacteriana).

Por el contrario, los inductores de la dimerización químicos presentados en la presente memoria no han mostrado evidencia de toxicidades incluso a dosis diez veces mayores que las necesarias para activar iCasp9. Adicionalmente, los sistemas enzimáticos no humanos, tales como VHS-tk y DC, incluyen un alto riesgo de respuestas inmunitarias destructivas contra las células transducidas. Tanto el gen suicida iCasp9 como el marcador de selección CD19 son de origen humano, y por lo tanto, debería ser menor probable que indujeran respuestas inmunitarias. Aunque el linaje de expresión del marcador seleccionable del gen suicida mediante un péptido escindible análogo a 2A de origen no humano pudiera suponer un problema, el linaje análogo a 2A tiene 20 aminoácidos de longitud, y es probablemente menos inmunógeno que una proteína no humana. Finalmente, la eficacia de activación del gen suicida en las células positivas para iCasp9 se compara favorablemente con la destrucción de células que expresan otros sistemas suicidas, con 90 % o más de linfocitos T modificados con iCasp9 eliminados después de una sola dosis del dimerizador, un nivel que es improbable que sea clínicamente eficaz.

El sistema iCasp9 presentado en la presente memoria también puede evitar limitaciones adicionales observadas en otras terapias basadas en células y/o basadas en genes suicidas. La pérdida de expresión debida al silenciamiento de la construcción transducida se observa frecuentemente después de la transducción retroviral de células de mamíferos. Las construcciones de expresión presentadas en el presente documento no mostraron evidencias de dicho efecto. No fue evidente una disminución en la expresión o muerte inducida, incluso después de un mes de cultivo.

Otro problema potencial a veces observado en otras terapias basadas en células y/o basadas en genes suicidas es el desarrollo de resistencia en células que tienen genes antiapoptóticos regulados positivamente. Este efecto se ha observado en otros sistemas suicidas que implican diferentes elementos de las rutas de muerte celular programada tales como Fas. iCasp9 se seleccionó como gen suicida para las construcciones de expresión presentadas en la presente memoria porque era menor probable que tuvieran dicha limitación. En comparación con otros miembros de la cascada apoptótica, la activación de caspasa-9 se produce más tarde en la ruta apoptótica y, por tanto, debería derivar los efectos de muchos reguladores antiapoptóticos, si no todos, tales como los miembros de la familia c-FLIP y bcl-2.

Una limitación potencial específica del sistema presentado en la presente memoria puede ser la dimerización espontánea de iCasp9, que a su vez, podría producir muerte celular no deseada y baja persistencia. Este efecto se ha observado en algunos otros sistemas inducibles que utilizan Fas. La observación de bajas tasas de muerte espontánea en las 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 utilizan construcciones de expresión, basadas en iCasp9.

Los eventos de integración que se derivan de la transducción retroviral de las MSC puede activar potencialmente una mutagénesis perjudicial, especialmente cuando hay múltiples inserciones del vector retroviral, produciendo efectos del número de copias indeseados y/u otros efectos indeseados. Estos efectos indeseados pueden desviar las ventajas de un sistema suicida transducido retroviralmente. Estos efectos frecuentemente se pueden minimizar usando un sobrenadante retroviral de calidad clínica obtenido a partir de líneas celulares productoras estables y condiciones de cultivo similares para transducir los linfocitos T. Los linfocitos T transducidos y evaluados en la presente memoria contienen en el intervalo de aproximadamente 1 a 3 integrantes (conteniendo el sobrenadante en el intervalo de aproximadamente 1×10^6 partículas víricas/ml). La sustitución del lentivirus por vectores retrovirales podría reducir adicionalmente el riesgo de genotoxicidad, especialmente en células con autorrenovación y potencial de diferenciación elevados.

Aunque una pequeña proporción de las MSC positivas para iCasp9 persiste después de una sola exposición a CID, estas células supervivientes se pueden destruir posteriormente mediante una exposición a CID adicional. En vivo, hay >99 % de reducción con dos dosis, pero es probable que las dosis repetidas de CID se necesiten para una reducción máxima en el escenario clínico. Los métodos no limitativos adicionales para proporcionar seguridad adicional cuando se utiliza un sistema de interruptor suicida inducible incluye rondas adicionales de clasificación

celular para aumentar la pureza de las poblaciones de células administradas y el uso de más de un sistema de gen suicida para potenciar la eficacia de la destrucción.

La molécula CD19, que se expresa fisiológicamente mediante linfocitos B, se eligió como el marcador seleccionable de las células transducidas, debido a sus potenciales ventajas sobre otros sistemas de selección disponibles, tales como la neomicina fosfotransferasa (neo) y el receptor del factor de crecimiento nervioso de baja afinidad (Δ LNGFR) truncado. “neo” codifica una proteína extraña inmunógena y requiere un cultivo de 7 días en un medio de selección, lo que aumenta la complejidad del sistema y daña potencialmente las células seleccionadas. La expresión de Δ LNGFR debería permitir estrategias de aislamiento similares a otros marcadores superficiales, pero estos no están ampliamente disponibles para uso clínico y sigue existiendo un problema subyacente acerca del potencial oncogénico del Δ LNGFR. Por el contrario, la selección magnética de las células positivas para iCasp9 mediante la expresión de CD19 usando dispositivos de calidad médica está disponible con facilidad y se ha comprobado que no tiene efectos notables sobre el crecimiento o diferenciación celular posteriores.

El procedimiento utilizado para la preparación y administración de las células del estroma mesenquimal que comprenden el interruptor de seguridad de la caspasa-9 también se puede usar en la preparación de embriocitoblastos y de citoblastos pluripotentes inducibles. Así, los procedimientos detallados en el presente ejemplo, tanto los embriocitoblastos como los citoblastos pluripotentes inducibles se pueden sustituir por las células del estroma mesenquimal proporcionadas en el ejemplo. En estas células, se pueden usar vectores retrovíricos y lentivíricos con, por ejemplo, promotores del CMV, o el promotor de ronina.

Ejemplo 6: Polipéptidos de caspasa-9 modificados de baja actividad basal y mínima pérdida de ligando Cl_{50}

La señalización basal, señalización en ausencia de agonista o agente de activación, es prevalente en multitud de biomoléculas. Por ejemplo, se ha observado en más de 60 receptores acoplados a la proteína G en (GPCR) de múltiples subfamilias [1], cinasas, tales como ERK y abl [2], inmunoglobulinas superficiales [3] y proteasas. Se ha teorizado que la señalización basal contribuye a una amplia variedad de eventos biológicos, desde el mantenimiento de la pluripotencia de los embriocitoblastos, desarrollo y diferenciación de los linfocitos B [4-6], diferenciación de los linfocitos T [2, 7], desarrollo de timocitos [8], endocitosis y tolerancia a fármacos [9], autoinmunidad [10] al crecimiento y desarrollo vegetal [11]. Aunque esta significación biológica no siempre se comprende bien o es evidente, la señalización basal defectiva puede producir consecuencias graves. La señalización proteica G_s basal defectuosa puede producir enfermedades, tales como retinitis pigmentosa, ceguera a los colores, diabetes insípida nefrogénica, resistencia a ACTH familiar, e hipercalcemia hipocalciúrica familiar [12, 13].

Aunque la homodimerización del iniciador natural de caspasa-9 es energéticamente desfavorable, haciendo que esté principalmente en forma de monómeros en solución [14-16], la actividad basal de bajo nivel inherente de la caspasa-9 sin procesar [15, 17] se potencia en presencia del “apoptosoma” de tipo Apaf-1, su regulador alostérico natural [6]. Adicionalmente, los niveles de expresión suprafisiológicos y/o de colocalización podrían producir una dimerización impulsada por proximidad, mejorando adicionalmente la activación basal.

En el polipéptido de caspasa-9 quimérico no modificado, la actividad basal innata de la caspasa-9 está significativamente disminuida por la eliminación el CAspase-Recruitment pro-Domain (CARD) [dominio de reclutamiento de caspasa] [18], sustituyéndolo por su dominio de unión a AP1903 análogo de alta afinidad, FKBP12-F36V. Su utilidad como “interruptor de seguridad” proapoptótico para terapia celular se ha demostrado bien en múltiples estudios [18-20]. Aunque su elevada actividad específica y baja actividad basal lo ha convertido en una potente herramienta en terapia celular, a diferencia de los receptores acoplados a la proteína G, no existen en la actualidad “agonistas inversos” [21] que eliminen la señalización basal, lo que puede ser deseable para la fabricación, y en algunas aplicaciones. La preparación de bancos de células maestras se ha demostrado como un desafío debido a la elevada 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 la caspasa-9, lo que lleva a la apoptosis no intencionada de las células transducidas [18].

Para modificar la actividad basal del polipéptido quimérico de caspasa-9, se usaron métodos basados en el “diseño racional” para diseñar mediante ingeniería genética 75 iCasp9 mutantes basándose en restos conocidos por tener papeles fundamentales en la homodimerización, inhibición mediada por XIAP, o la fosforilación (Figura 44, Tabla siguiente) en lugar de en la “evolución dirigida” [22] que utiliza múltiples ciclos de cribado y presión selectiva sobre genes mutados aleatoriamente. La activación de la caspasa-9 impulsada por la dimerización se ha considerado un modelo dominante de la activación del iniciador de Caspasa [15, 23, 24]. Para reducir la dimerización espontánea, se realizó la mutagénesis dirigida al sitio de restos fundamentales para la homodimerización y, por tanto, la señalización basal de la caspasa-9. La sustitución de cinco restos clave en la hebra $\beta 6$ (G402-C-F-N-F406), la interfase de dimerización clave de la caspasa-9, con los que el efector constitutivamente dimérico Caspasa-3 (C264-I-V-S-M268) la convirtió en una proteína dimérica constitutivamente insensible a la activación con Apaf-1 sin reordenamientos estructurales significativos [25]. Para modificar la homodimerización espontánea, se realizó una mutagénesis sistémica de los cinco restos, basándose en química de aminoácidos, y en los correspondientes restos de los iniciadores Caspasa 2, 8, 9 y 10 que existen predominantemente como monómero en solución [14, 15]. Tras realizar y analizar veintiocho mutantes de iCasp9 mediante un ensayo de destrucción indicador basado en la fosfatasa alcalina (SEAP) (Tabla, más adelante), se descubrió que la mutación N405Q disminuía la señalización basal con un coste moderado (<10 veces) de mayor Cl_{50} a AP1903.

Puesto que la proteólisis, habitualmente necesaria para la activación de la caspasa, en ningún caso es necesaria para la activación de la caspasa-9 [26], la “carga” termodinámica se aumentó para inhibir la autoproteólisis. Adicionalmente, puesto que la unión de la caspasa-9 mediada por XIAP atrapa la caspasa-9 en un estado monomérico para atenuar su actividad catalítica y basal [14], se realizaron esfuerzos para reforzar la interacción entre XIAP y caspasa-9 mediante mutagenización del tetrapéptido fundamental para la interacción con XIAP (A316-T-P-F319, D330-A-I-S-S334). A partir de estas 17 iCasp-9 mutantes, se determinó que la mutación D330A disminuía la señalización basal con un coste mínimo (<5 veces) de Cl_{50} de AP1903.

El tercer enfoque se basó en hallazgos anteriormente notificados de que la caspasa-9 se inhibía por cinasas después de la fosforilación de S144 por PKC- ζ [27], S183 por la proteína cinasa A [28], S196 por Akt1 [29], y se activará tras la fosforilación de Y153 por c-abl [30]. Estos “frenos” deberían mejorar la Cl_{50} , o sustituciones con restos imitados de fosforilación (“fosfomiméticos”) podría aumentar estos “frenos” para disminuir la actividad basal. Sin embargo, ninguno de los 15 mutantes de un solo resto basados en estos restos pudo disminuir con éxito la Cl_{50} de AP1903.

Se pueden aplicar métodos como los que se han detallado, por ejemplo, en los Ejemplos 1-5, y en la totalidad de esta descripción, con las modificaciones adecuadas, según sea necesario, a los polipéptidos de caspasa-9 modificados quiméricos, así como a varias células terapéuticas.

Ejemplo 7: Materiales y métodos

Mutagénesis dirigida al sitio de la caspasa-9:

Para modificar la señalización basal de la caspasa-9, se realizó una mutagénesis dirigida al sitio basada en la PCR [31] con oligonucleótidos que contenían mutaciones y Kapa (Kapa Biosystems, Woburn, MA). Después de 18 ciclos de amplificación, el plásmido precursor se retiró con la enzimas de restricción DpnI dependiente de la metilación que deja los productos de la PCR intactos. 2 μ l de la solución resultante se usaron para transformar químicamente XL1-azul o DH5 α . Los mutantes positivos se identificaron posteriormente mediante secuenciación (SeqWright, Houston, TX).

Mantenimiento de la línea celular y transfección:

Células HEK293T/16 de paso temprano (ATCC, Manassas, VA) se mantuvieron en IMDM, GlutaMAX™ (Life Technologies, Carlsbad, CA) suplementado con FBS al 10 %, 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomina hasta la transfección en una atmósfera de aire humidificado, 37 °C, 5 % CO₂/95 % aire. Las células en fase de crecimiento logarítmica se transfectaron transitoriamente con de 800 ng a 2 μ g de plásmido de expresión que codificaba mutantes de iCasp9 y 500 ng de un plásmido de expresión que codificaba el promotor SR α impulsado por SEAP por millón de células en tubos cónicos de 15 ml. Se utilizaron caspasa-9 catalíticamente inactiva (C285A) (sin el dominio FKBP) plásmido de expresión “vacío” (“pSH1-null”) para mantener los niveles de plásmido total constantes entre transfecciones. Se usó el reactivo de transfección GeneJammer® en una proporción de 3 μ l por μ g de ADN plásmido para transfectar transitoriamente células HEK293T/16 en ausencia de antibióticos. 100 μ l o 2 ml de la mezcla de transfección FuGENE-se añadieron a cada pocillo de una placa de 96 pocillos o de 6 pocillos, respectivamente. Para el análisis SEAP, se añadieron diluciones logarítmicas de AP1903 después de una incubación mínima de 3 horas después de la transfección. Para las transferencias western, las células se incubaron durante 20 minutos con AP1903 (10 nM) antes de la recogida.

Ensayo de la fosfatasa alcalina secretada (SEAP):

De veinticuatro a cuarenta horas tras el tratamiento con AP1903, ~100 μ l de sobrenadantes se recogieron en una placa de 96 pocillos y se sometieron a ensayo para analizar la actividad SEAP como se ha descrito [19, 32]. En resumen, tras una desnaturalización térmica a 65 °C durante 45 minutos para reducir el fondo producido por las fosfatasas alcalinas endógenas (y derivadas de suero) que son sensibles al calor, 5 μ l de sobrenadantes se añadieron a 95 μ l de PBS y se añadieron a 100 μ l de tampón de sustrato, que contenía 1 μ l de fosfato de 4-metillumbeliferilo 100 mM (4-MUP; Sigma, St. Louis, MO) resuspendido en dietanolamina 2 M. La hidrólisis del 4-MUP por SEAP produce un sustrato fluorescente con excitación/emisión (355/460 nm), que se puede medir fácilmente. Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos opacas negras para minimizar las pérdidas de fluorescencia entre pocillos (Figura 45).

Análisis por transferencia Western:

Las células HEK293T/16 transfectadas transitoriamente con 2 μ g de plásmido durante 48-72 horas se trataron con AP1903 durante de 7,5 a 20 minutos (como se indica) a 37 °C y posteriormente se lisaron en 500 μ l de tampón RIPA (Tris HCl 0,01 M, pH 8,0/140 mM NaCl/Triton X-100 al 1 %/fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM/desoxicolato de sodio al 1 %/SDS al 0,1 %) con el cóctel inhibidor de proteasa Halt™. Los lisados se recogieron y se lisaron sobre hielo durante 30 min. Tras aglomerar los residuos celulares, las concentraciones de proteínas de los sobrenadantes superpuestos se midieron en placas de 96 pocillos con el ensayo de proteínas BCA™ según lo recomendado por el fabricante. 30 μ g de proteínas se ebulleron en tampón de muestra Laemmli (Bio-Rad, Hercules, CA) con 2-mercaptoetanol al 2,5 % durante 5 min a 95 °C antes de separarse mediante el gel Criterion TGX 10 % Tris/proteína glicina. Las membranas se sondearon con anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra caspasa-9 humana 1/1000

seguido por un anticuerpo secundario de cabra dirigido contra F(ab')₂ de IgG de conejo conjugado con HRP a 1/10.000 (Bio-Rad). Las bandas de proteínas se detectaron utilizando sustrato quimioluminiscente Supersignal West Femto. Para garantizar carga equivalente de la muestra, las transferencias se arrastraron durante 1 hora a 65 °C con tampón de arrastre Restore PLUS Western Blot antes de su marcado con anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra actina 1/10.000. Salvo que se indique lo contrario, todos los reactivos se adquirieron de Thermo Scientific.

Los métodos y construcciones analizados en los Ejemplos 1-5, y en la totalidad de la presente memoria descriptiva, también se pueden usar para analizar y utilizar los polipéptidos de caspasa-9 modificados.

Ejemplo 8: Evaluación y actividad de los polipéptidos de caspasa-9 modificados quiméricos

Comparación entre 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 modificados quiméricos, se examinaron las actividades SEAP de las células HEK293T/16 cotransfectadas con SEAP y diferentes cantidades de iCasp9 mutantes. iCasp9 D330A, N405Q, yD330A-N405Q mostraron una actividad basal significativamente menor que la de iCasp9, no modificada para las células transfectadas con uno de 1 µg de iCasp9 por millón de células (Unidades de actividad SEAP relativa de 148928, 179081, 205772 vs. 114518) o 2 µg de iCasp9 por millón de células (136863, 175529, 174366 vs. 98889) (Figuras 46A, 46B). La señalización basal de los tres polipéptidos de caspasa-9 modificados quiméricos cuando se transfectaron a 2 µg por millón de células fue significativamente superior (valor p <0,05). iCasp9 D330A, N405Q y D330A-N405Q también mostraron valores de Cl₅₀ estimados más grandes para AP1903, pero siguieron siendo menores de 6 pM (basándose en el ensayo SEAP), en comparación con 1 pM para WT (Figura 46C), lo que los convierte en interruptores de apoptosis potencialmente útiles.

Evaluación de los niveles de expresión de proteínas y proteólisis:

Para excluir la posibilidad de que la reducción observada en la actividad basal de los polipéptidos de caspasa-9 modificados quiméricos fuera atribuible a una disminución en la estabilidad de la proteína o una variación en la eficacia de la transfección, y para examinar la autoproteólisis de la iCasp9, se analizaron los niveles de expresión de proteínas de las variantes de caspasa-9 en células HEK293T/16. Los niveles de proteína de los polipéptidos de caspasa-9 no modificados quiméricos, iCasp9 D330A e iCasp9 D330A-N405Q, todos mostraron niveles de proteínas similares en las condiciones de transfección utilizadas en este estudio (Figura 47A). Por el contrario, la banda de iCasp9 N405Q apareció más oscura que las demás, especialmente cuando se usaron 2 µg de los plásmidos de expresión. La autoproteólisis no fue fácilmente detectable en las condiciones de transfección utilizadas, probablemente debido a que solamente se recogieron células viables. Una transferencia adicional de proteína anti-actina confirmó que se habían cargado cantidades comparables de lisados en cada hilera (Figura 47B). Estos resultados respaldan la baja señalización basal observada en los mutantes D330A, N405Q y D330A-N405Q de iCasp9, observada en los ensayos SEAP.

Discusión:

Basándose en el ensayo de cribado SEAP, estos tres polipéptidos de caspasa-9 modificados quimérico mostraron mayor actividad SEAP independiente de AP1903, en comparación con los transfectantes iCasp9 WT y, por tanto, una señalización basal menor. Sin embargo, la doble mutación (D330-N405Q) no consiguió disminuir adicionalmente ni la actividad basal ni las Cl₅₀ (0,05 nM) vs. los mutantes de aminoácido individual (Figura 46A, 46B, 46C). Las diferencias observadas no parecieron deberse a la inestabilidad de la proteína o a la cantidad diferencial de plásmidos utilizada durante la transfección (Figura 47B).

Ejemplo 9: Evaluación y actividad de los polipéptidos de caspasa-9 modificados quiméricos

La caspasa-9 inducible proporciona una destrucción autónoma de las células independiente del ciclo celular de una forma dependiente de AP1903. Mejorar las características de este polipéptido de caspasa-9 inducible permitiría una aplicación incluso más amplia. Es deseable disminuir la citotoxicidad independiente del ligando de la proteína, y aumentar su destrucción a bajos niveles de expresión. Aunque la citotoxicidad independiente de ligando no es un problema en niveles de expresión relativamente bajos, puede tener un impacto notable cuando los niveles de expresión pueden alcanzar uno o más órdenes de magnitud mayor que en las células primarias diana, tal como durante la producción del vector. También, las células pueden ser diferencialmente sensibles a bajos niveles de expresión de la caspasa debido al nivel de inhibidores de la apoptosis, como XIAP y Bcl-2, que expresan las células. Por lo tanto, para volver a diseñar mediante ingeniería genética el polipéptido de caspasa para que tenga menor actividad basal y posiblemente mayor sensibilidad al ligando AP1903, se establecieron cuatro estrategias de mutagénesis.

Dominio de dimerización: Aunque la caspasa-9 es un monómero en solución a niveles fisiológicos, en altos niveles de expresión, como se produce en el "apoptosoma" proapoptótico impulsado por Apaf, la caspasa-9 puede dimerizar, lo que produce la autoprotólisis en D315 y un importante aumento de la actividad catalítica. Como C285 forma parte del sitio activo, la mutación C285A es catalíticamente inactiva, y se utiliza como construcción de control negativo. La dimerización implica una interacción muy cercana entre cinco restos particulares, en concreto, G402, C403, F404, N405 y F406. Para cada resto, se construyó una variedad de sustituciones de aminoácidos, que representaban diferentes

clases de aminoácidos (p. ej., hidrófobos, polares, etc.). De forma interesante, todos los mutantes de G402 (es decir, G402A, G402I, G402Q, G402Y) y C403P produjeron un polipéptido de caspasa catalíticamente inactivo. Mutaciones C403 adicionales (es decir, C403A, C403S y C403T) fueron similares a la caspasa natural, y no se prosiguió adicionalmente. Todas las mutaciones en F404 disminuyeron la actividad basal, pero también reflejaron una sensibilidad reducida a Cl_{50} , desde ~ 1 log hasta no mensurable. En orden de eficacia, fueron: F404Y > F404T, F404W >> F404A, F404S. Las mutaciones en N405 bien no tuvieron efectos, como en N405A, aumentaron la actividad basal, como en N405T, o disminuyeron la actividad basal concomitante con un efecto perjudicial bien pequeño (~ 5 -veces) o grande sobre Cl_{50} , como para N405Q y N405F, respectivamente. Finalmente, análogamente a F404, todas las mutaciones en F406 disminuyeron la actividad basal, y reflejaron una sensibilidad reducida a Cl_{50} , desde ~ 1 log hasta no mensurable. En orden de eficacia, fueron: F406A F406W, F406Y > F406T >> F406L.

Se construyeron y analizaron algunos polipéptidos que tenían mutaciones compuestas dentro del dominio de dimerización, pero sustituyendo los 5 restos análogos por restos de otras caspasas, conocidas por ser monoméricas (p. ej., Caspasa-2, Caspasa-8, Caspasa-10) o dimericas (p. ej., Caspasa-3) en solución. Los polipéptidos de caspasa-9, que contienen el cambio en los 5 restos de la Caspasa-2, Caspasa-3 y Caspasa-8 junto con una sustitución de alanina AAAAA fueron todas catalíticamente inactivas, mientras que los restos equivalentes de la Caspasa-10 (ISAQT) produjeron una actividad basal reducida pero mayor Cl_{50} .

En su conjunto, basándose en la combinación de una actividad basal consistentemente menor, combinado con solo un leve efecto sobre la Cl_{50} , N405Q se seleccionó para experimentación adicional. Para mejorar su eficacia, se sometió a ensayo una versión con optimización de codones del polipéptido de caspasa-9 modificado, con la sustitución N405Q, denominado N405Qco. Este polipéptido pareció ser marginalmente más sensible a AP1903 que el polipéptido de caspasa-9 natural sustituido con N405Q.

Mutantes del sitio de escisión: Tras la agregación de la caspasa-9 dentro del apoptosoma o mediante homodimerización reforzada por AP1903, aparece la autoprotólisis en D315. Esto produce un nuevo extremo amino en A316, al menos transitoriamente. De manera interesante, el tetrapéptido desvelado de nueva aparición, 316 ATPF 319 , se une al inhibidor de caspasa-9, XIAP, quien compite por la dimerización con la propia caspasa-9 en el motivo de dimerización, GCFNF, anteriormente descrito. Por lo tanto, el resultado inicial de la escisión de D315 es la unión a XIAP, que atenúa adicionalmente la activación adicional de caspasa-9. Sin embargo, existe un segundo sitio de escisión de la caspasa en D330, que es la diana del efector de caspasa posterior, la caspasa-3. A medida que se acumula presión proapoptótica, D330 cada vez se escinde más, liberando el péptido pequeño de unión a XIAP dentro del resto 316 a 330, y por tanto, eliminando este inhibidor de caspasa-9 mitigador. Se construyó un mutante D330A, que disminuía la actividad basal, pero no tanto como N405Q. Mediante ensayo de SEAP para número de copias alto, también se reveló un pequeño aumento en la Cl_{50} , pero para un número de copias bajo en linfocitos T primarios, lo que se produjo realmente fue un pequeño aumento en la Cl_{50} con una destrucción mejorada de las células diana. La mutación en el sitio de la autoproteólisis, D315, redujo la actividad basal, pero esto produjo un importante aumento en la Cl_{50} , probablemente porque la escisión de D330 era posteriormente necesaria para la activación de la caspasa. Una mutación doble en D315A y D330A produjo una caspasa-9 inactiva “bloqueada” que no se pudo procesar correctamente.

Se crearon otros mutantes de D330, incluidos D330E, D330G, D330N, D330S y D330V. La mutación en D327 también impidió la escisión en D330, ya que el sitio de escisión de consenso en Caspasa-3 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 disminuyeron la actividad basal y no se investigaron adicionalmente.

Mutantes de unión a XIAP: Como se ha descrito anteriormente, la autoproteólisis en D315 revela un tetrapéptido de unión a XIAP, 316 ATPF 319 , que “atrae” XIAP hacia el complejo de caspasa-9. La sustitución de ATPF con el tetrapéptido de unión a XIAP análogo, AVPI, procedente del inhibidor anti-XIAP derivado de mitocondrias, SMAC/DIABLO, debería unirse más estrechamente a XIAP y disminuir la actividad basal. Sin embargo, esta sustitución de 4 restos no tuvo efectos. Otras sustituciones en el motivo ATPF se clasificaron desde sin efectos, (es decir, T317C, P318A, F319A) a disminuir la actividad basal bien muy levemente (es decir, T317S, levemente (es decir, T317A) a un importante aumento (es decir, A316G, F319W) en la Cl_{50} . En su conjunto, estos efectos de cambiar el tetrapéptido de unión a XIAP fueron leves; sin embargo, T317S se seleccionó para su análisis en mutaciones dobles (descritas más adelante), puesto que los efectos sobre la Cl_{50} fueron los más leves del grupo.

Mutantes de fosforilación: Se había notificado que un pequeño número de restos de caspasa-9 eran dianas de fosforilaciones tanto inhibitoras (p. ej., S144, S183, S195, S196, S307, T317) como activadoras (es decir, Y153). Por lo tanto, se analizaron mutaciones que bien imitaban la fosforilación (“fosfomiméticos”) por sustitución con un resto ácido (p. ej., Asp) o eliminaban la fosforilación. En general, la mayoría de las mutaciones estudiadas, independientemente de si eran fosfomiméticas o no, disminuyeron la actividad basal. Entre los mutantes con menor actividad basal, las mutaciones en S144 (es decir, S144A y S144D) y S1496D no tuvieron efecto discernible sobre la IC_{50} , los mutantes S183A, S195A y S196A aumentaron la Cl_{50} levemente, y los mutantes Y153A, Y153A y S307A tuvieron un importante efecto perjudicial sobre la Cl_{50} . Debido a la combinación de disminuir la actividad basal y un efecto mínimo, de haber alguno, sobre la Cl_{50} , S144A se seleccionó para las mutaciones dobles (descritas más adelante).

- Mutantes dobles: Para combinar la eficacia ligeramente mejorada de la variante D330A con posibles restos que pudieran disminuir adicionalmente la actividad basal, se construyeron y analizaron numerosos dobles mutantes D330A. De forma típica, mantuvieron menor actividad basal con solo un pequeño aumento en la CI_{50} , incluidas segundas mutaciones en N405Q, S144A, S144D, S183A y S196A. El doble mutante D330A-N405T tuvo mayor actividad basal y los dobles mutantes en D330A con Y153A, Y153F y T317E fueron catalíticamente inactivos. Se analizó una serie de dobles mutantes con baja actividad basal N405Q, previstos para mejorar la eficacia o disminuir la CI_{50} . Todos ellos parecieron ser similares a N405Q en términos de baja actividad basal y leve aumento en la CI_{50} con respecto a CaspaCIDE-1.0, e incluyeron N405Q con S144A, S144D, S196D y T317S.
- 5 La Figura 52A representa un ensayo SEAP para estudiar la actividad basal y la sensibilidad al CID de algunos de los mutantes del dominio de dimerización. Esto muestra que N405Q (círculos negros) fue el más sensible a AP1903 de los mutantes analizados con menor actividad basal que la caspasa-9 WT, como se determina por un desplazamiento hacia una señalización independiente de AP1903. F406T fue el menos sensible a CID de este grupo. 52B muestra una tabla de actividad SEAP máxima (que refleja la actividad basal) y las CI_{50} .
- 10 La Figura 53A representa la actividad SEAP independiente del dímero de los polipéptidos de caspasa mutantes D330A y N405Q, junto con el doble mutante D330A-N405Q. Se muestran los resultados de múltiples transfecciones (N = 7 a 13), que ilustran que N405Q tiene menor actividad basal que D330A y que el doble mutante es intermedio.
- 15 La Figura 53B representa el promedio (+ dev. est., n =5) IC_{50} de los polipéptidos de caspasa mutantes D330A y N405Q, junto con el doble mutante D330A-N405Q. Los resultados muestran que D330A es algo más sensible a AP1903 que los mutantes N405Q pero aproximadamente 2 veces menos sensible que la caspasa-9 WT en un ensayo de transfección transitoria.
- 20 La Figura 54 representa un ensayo SEAP que refleja la caspasa-9 WT, N405Q, C285A inactivo y varios mutantes de T317 dentro del dominio de unión a XIAP. Los resultados muestran que T317S u T317A pueden reducir la actividad basal sin un importante desplazamiento en la CI_{50} hacia AP1903. Por lo tanto, T317S se seleccionó para preparar mutantes dobles con N405Q.
- 25 La Figura 55 representa las CI_{50} del experimento 50B, que muestra que T317A y T317S tienen CI_{50} similares a las del polipéptido de caspasa-9 natural a pesar de tener menor actividad basal.
- 30 La Figura 56 representa la actividad de SEAP independiente del dímero para varios mutantes de D330 que muestra que todos los miembros de esta clase analizados, incluidos D330A, D330E, D330N, D330V, D330G y D330S, tienen menos actividad basal que la caspasa-9 natural.
- 35 La Figura 57 muestra el resultado de una transferencia Western que ilustra que las mutaciones D330 bloquean la escisión en D330, lo que produce una banda pequeña algo ensanchada (migración más lenta) (marcador < 20 kDa). Otras transferencias muestran que la mutación D327 también bloquean la escisión.
- 40 La Figura 58 muestra las intensidad de fluorescencia promedio de múltiples clones de PG13 transducidos 5X con retrovirus que codifican los polipéptidos de caspasa-9 indicados. Una menor actividad basal se traduce, de forma típica, en niveles de expresión más altos del gen de la caspasa-9 junto con el indicador genéticamente relacionado, CD19. Los resultados muestran que, en promedio, los clones que expresan el mutante N405Q expresan niveles más elevados de CD19, lo que refleja la menor actividad basal de N405Q respecto de los mutantes D330 o la caspasa-9 WT.
- 45 La Figura 59 muestra los efectos de varios polipéptidos de caspasa con las principales copias individuales en linfocitos T primarios. Esto puede reflejar con más precisión cómo se usarán terapéuticamente estos genes suicidas. Sorprendentemente, los datos muestran que el mutante D330A es realmente más sensible a AP1903 a bajos títulos y destruye al menos tan bien como la caspasa-9 WT cuando se estudia en un ensayo de 24 horas. El mutante N405Q es menos sensible a AP1903 y no puede destruir células diana tan eficazmente en un plazo de 24 horas.
- 50 La Figura 60 muestra los resultados de transducir 6 muestras de linfocitos T independientes procedentes de donantes sanos distintos. Estos resultados confirman que el mutante D330A (mut) es más sensible a AP1903 que el polipéptido de caspasa-9 natural.
- 55 La Figura 61 muestra la CI_{50} promedio, el intervalo y la desviación estándar de los 6 donantes sanos mostrados en la Fig. 56. Estos datos muestran que la mejora es estadísticamente significativa.
- 60 La Figura 62 muestra los resultados de varios mutantes D330, que revela que los seis mutantes D330 estudiados (D330A, E, N, V, G y S) son más sensibles a AP1903 que el polipéptido de caspasa-9 natural.
- 65 La Figura 63 muestra que el mutante N405Q junto con otros mutantes del dominio de dimerización, incluidos N404Y y N406Y, pueden destruir los linfocitos T diana de forma indistinguible del polipéptido de caspasa-9 natural o D330A en un plazo de 10 días. Las células que recibieron AP1903 el Día 0 recibieron una segunda dosis de

AP1903 el día 4. Estos datos respaldan el uso de mutantes de caspasa-9 de sensibilidad reducida, como N405Q, como parte de un interruptor de eficacia regulada.

5 La Figura 64 muestra los resultados de la optimización de codones del polipéptido de caspasa N405Q, denominado “N405Qco”, que revela que la optimización de codones, que probablemente produce un aumento de la expresión, solo tiene un efecto muy sutil sobre la función de caspasa inducible. Esto probablemente refleja el uso de codones comunes en el gen original de caspasa-9.

10 La Figura 65 muestra que el polipéptido de caspasa-9 tiene una curva de respuesta a la dosis in vivo, que se podría usar para eliminar una fracción variable de linfocitos T que expresan el polipéptido de caspasa-9. Los datos también muestran que una dosis de 0,5 mg/kg de AP1903 es suficiente para eliminar la mayoría de linfocitos T modificados in vivo.

15 La Figura 66 muestra la curva de respuesta a la dosis del mutante D330E in vivo. Este estudio también muestra que la eliminación de linfocitos T se puede titular in vivo.

20 Conclusiones: Como se describe, a partir de este análisis de 78 mutantes, de las mutaciones de un solo mutante, las mutaciones D330 combinan una eficacia algo mejorada con una actividad basal ligeramente reducida. Los mutantes N405Q también son atractivos porque tienen una actividad basal muy baja con solo una eficacia algo disminuida, que se refleja en un aumento de 4-5 veces en la CI₅₀. Los experimentos con linfocitos T primarios han mostrado que los mutantes N405Q pueden destruir eficazmente células diana, pero con una cinética algo más lenta que los mutantes D330, lo que lo convierte en potencialmente muy útil para un interruptor suicida graduado que destruye parcialmente después de una dosis inicial de AP1903, y se puede conseguir incluso la destrucción completa después de una segunda dosis de AP1903.

25 La siguiente tabla proporciona un resumen de la actividad basal y valor de CI₅₀ de varios polipéptidos de caspasa-9 modificados quiméricos preparados y analizados según los métodos descritos en la presente memoria. Los resultados se basan en un mínimo de dos ensayos SEAP independientes, salvo para un subconjunto (es decir, A316G, T317E, F326K, D327G, D327K, D327R, Q328K, Q328R, L329G, L329K, A331K, S196A, S196D, y los siguientes mutantes dobles: D330A con S144A, S144D o S183A; y N405Q con S144A, S144D, S196D o T317S) que se analizaron una vez. Se adoptaron cuatro estrategias multicomponentes para generar los polipéptidos de caspasa-9 modificados quiméricos estudiados. Los polipéptidos de caspasa-9 modificados “muertos” ya no son sensibles a AP1903. Los mutantes dobles se indican por un guión, por ejemplo, D330A-N405Q denota un polipéptido de caspasa-9 modificado que tiene una sustitución en la posición 330 y una sustitución en la posición 405.

35 Tabla 5 Clases de mutantes de caspasa

Actividad basal	Dominio de homodimerización	Sitios de escisión e interacción XIAP	Fosforilación	Mutantes dobles, Misc.	Mutantes totales
Actividad basal disminuida y CI ₅₀ similar			S144A		80
			S144D		*, prevista
		T317S	S196D		
Actividad basal disminuida pero CI ₅₀ mayor	N405Q	D330A	S183A	D330A-N405Q	Negrita, analizado 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		

Actividad basal disminuida pero Cl₅₀ mucho mayor	F404T	D315A	Y153A	
	F404W	A316G	Y153F	
	N405F	F319W	S307A	
	F406T			
Actividad basal y Cl₅₀ similares	C403A	³¹⁶ ATPF ³¹⁹ AVPI (SMAC/Diablo)		
	C403S	T317C		
	C403T	P318A		
	N405A	F319A		
Actividad 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. and 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. and 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, and R. A. Eisenberg, B cell receptor editing in tolerance and autoimmunity. *Ann NY 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.
- 5 15. Renatus, M., et al., Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase-9. *Proc Natl Acad Sci USA*, 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, and Y. Shi, Oligomerization and activation of caspase-9, induced by Apaf-1 CARD. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002. 99(7): p. 4197-202.
- 10 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, and 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.
- 15 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. and F. H. Arnold, In the light of directed evolution: pathways of adaptive protein evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009. 106 Suppl 1: p. 9995-10000.
- 20 23. Boatright, K. M. and 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, and 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.
- 30 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. and Wright, D. A., Site-directed mutagenesis in one day with >80 % efficiency. *Strategies*, 1996. 9(3): p. 3-4.
- 35 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.
- 40 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.

Ejemplo 10: Inducción de niveles controlados de apoptosis mediante la administración de dosificaciones variables de ligando inductor

45 Aunque en algunos escenarios clínicos se puede desear una eliminación rápida y completa de los linfocitos transferidos de forma adoptiva (p. ej., linfocitos T CAR), existen otros muchos escenarios en los que pueda ser más deseable la eliminación y reducción parcial de estos linfocitos. La posibilidad de dichos escenarios está controlada por diversas propiedades inherentes al receptor de antígeno quimérico (CAR) de linfocitos T diana, y de los tipos de eventos adversos (EA) asociados. Estas propiedades incluyen la molécula y el órgano diana, la severidad de la toxicidad y la rapidez del inicio. Existen al menos 5 tipos diferentes de linfocitos T/CAR diana que tienen diferentes perfiles con respecto a estas propiedades que controlan la eficacia y seguridad que pueden estar asociados con escenarios clínicos que se podrían beneficiar de la administración de cantidades más controladas del ligando multimérico para inducir la apoptosis en un número más discreto de células terapéuticas. Esto se puede tener en cuenta cuando se distingue entre el uso de un reostato de seguridad versus un interruptor on/off en terapia celular:

60 **Categoría 1: Los antígenos de diferenciación** (p. ej., MART, gp100, CEA, Her-2/neu) se expresan a bajos niveles en adultos. Los CAR de linfocitos T que se dirigen a estos antígenos se han asociado con tasas elevadas de EA graves y que suponen una amenaza para la vida que han limitado su viabilidad clínica, y la mayoría de ellos no han ido más allá de las primeras etapas de los ensayos clínicos. Se han producido complicaciones inesperadas y fallecimientos de pacientes debido al bajo nivel de expresión de estos antígenos en órganos normales (p. ej., pulmón).

65 **Categoría 2: Dianas en tejido no esencial** (p. ej., CD19 en linfocitos B, tiroglobulina en tiroides, PSMA en células prostáticas). Estos CAR de linfocitos T han mostrado una importante actividad antineoplásica en pacientes, pero se han asociado con EAG incluidos fallecimientos de pacientes, frecuentemente relacionados con el síndrome de lisis tumoral y tormenta de citocinas en pacientes que, por otra parte, respondían al tratamiento.

Categoría 3: Antígenos de cáncer de testículo (CTA) (*p. ej.*, NY-ESO-1, MAGE-A1, MAGE-A3; 50 % de los cánceres expresan cualquiera de estas dos familias.) Los CTA se expresan en células germinales y en algunos tumores. Preocupaciones similares a las de la Categoría 1 debido a reactividad cruzada con miembros de la familia.

Categoría 4: Antígenos únicos (*p. ej.*, EGFRvIII) son probablemente los mejores cuando están disponibles, pero siguen siendo una mayoría de tumores.

Categoría 5: Estroma tumoral (*p. ej.*, VEGF-R2, FAP) Altos niveles en tumores, bajos niveles en tejido normal. Se han producido pocas respuestas completas (CR) pero el riesgo potencial de EAG es alto.

La terapia general con linfocitos T, por ejemplo, agregar linfocitos T después de un trasplante de citoblastos, puede dar como resultado eventos adversos tales como los que se detallan en la presente memoria, relacionada con la enfermedad del injerto vs hospedador. Un nivel controlado de eliminación de linfocitos T, tal como una inducción de la apoptosis controlada en un número discreto de los linfocitos T trasplantados, puede aliviar los síntomas de la GvHD, y seguir permitiendo una reconstitución suficiente del sistema inmunitario del paciente. Para determinar el nivel de ligando inductor, se pueden administrar a los pacientes dosis crecientes gradualmente, por ejemplo, aquellos pacientes que se han sometido a un haplotrasplante con citoblastos seleccionados para CD34. La dosificación deseada del inductor será la dosis que puede facilitar el injerto, potenciar la reconstitución inmunitaria y mejorar potencialmente el efecto del injerto contra la leucemia (GvL) reduciendo al mismo tiempo la gravedad y la duración de la GvHD aguda grave. En un ejemplo, los sujetos que presentan GvHD aguda grave (Grados 3 y 4), así como aquellos sujetos con Grado 1 y 2 que progresan durante la terapia con corticoesteroides pueden recibir, por ejemplo, un único vial de 40 mg de AP1903 (5 mg/ml; 8 ml) en infusión de 2 horas. Para pacientes que pesan hasta 100 kg, esto equivale a una dosificación de al menos 0,4 mg/kg o más.

La CI_{50} de iCasp9 está en el intervalo de 0,001-0,01 nM, y la curva de respuesta a la dosis parece pronunciada para una concentración de ~ 1-2 unidades logarítmicas. Puesto que la $C_{máx}$ para una infusión de 2 horas de 0,4 mg/kg alcanza de 100 a 1000 nM en un plazo de 15-30 min, los niveles de AP1903 en el organismo rápidamente superan en >3 unidades logarítmicas el valor de la CI_{50} para iCasp9, lo que permite que la iCasp9 funcione eficazmente como un “interruptor on/off”, con una destrucción celular >90 % dentro del primer punto temporal medido (es decir, 30 minutos) y una unidad logarítmica adicional de destrucción en un plazo de 24 horas. Las células terapéuticas que expresan la caspasa-9 inducible “natural” se pueden eliminar parcialmente mediante administración de la cantidad o concentración adecuada del ligando inductor, dejando algunas células terapéuticas en el paciente. De forma alternativa, las células terapéuticas pueden expresar una variante de la caspasa-9 inducible, que tiene una CI_{50} diferente, que puede responder a una cantidad o concentración diferente del ligando inductor.

Otros ejemplos de métodos para destruir selectivamente células terapéuticas que contienen el interruptor de seguridad, o solamente una fracción de estas células terapéuticas, se proporcionan en el presente documento.

Un paciente de cáncer de colon con enfermedad metastásica hacia los pulmones y el hígado, y resistente al múltiples tratamientos estandarizados se trató con linfocitos T modificados con CAR ErbB2. A los 15 minutos de iniciar la infusión, el paciente desarrolló insuficiencia respiratoria e infiltración pulmonar. Siguió una tormenta de citocinas y, a pesar de las medidas heroicas, el paciente falleció en un plazo de 5 días. La toxicidad de linfocitos T CAR fue debida a un direccionamiento a órganos no diana (pulmón) y fue rápida y una amenaza para la vida. El médico a cargo del tratamiento quiso finalizar linfocitos T modificados con CAR ErbB2 tan rápida y completamente como fuera posible. En este tipo de escenario, un interruptor de seguridad “on/off”, que destruya tantas células terapéuticas como fuera posible, habría sido la opción más adecuada.

Un paciente de leucemia tratado con quimioterapia no consiguió CR, lo que es necesario para ser candidato a un HSCT potencialmente curativa. Se administró terapia con linfocitos T CAR dirigidos a CD19. El paciente respondió rápidamente pero debido a la prolongada carga de la enfermedad, desarrolló el síndrome de lisis tumoral y se puso enfermo de forma crítica necesitando ingreso en UCI, esteroides sistémicos y terapia de soporte vital. El paciente respondió a esta terapia, pero posteriormente desarrolló una recidiva en su leucemia, supuestamente debido a la inmunosupresión global producida por los esteroides. La toxicidad de los linfocitos T CAR no estuvo relacionada con una especificidad molecular no prevista o en órganos no diana, sino debida a la sobre eficacia de la respuesta, que produjo un síndrome de lisis tumoral y una tormenta de citocinas que fueron una amenaza para la vida. El médico a cargo del tratamiento puede haber sido reacio a finalizar totalmente un tratamiento eficaz para una leucemia que era una amenaza para la vida induciendo la apoptosis y destruyendo la totalidad de las células terapéuticas. El médico habría estado más inclinado a simplemente reducir el número de linfocitos T CAR para modular la actividad antineoplásica hasta un nivel más seguro y sostenible. En este escenario clínico, puede ser preferible un método para destruir selectivamente solamente una fracción de las células terapéuticas.

Una paciente de dos años de edad con neuroblastoma de Estadio 4 recibe una infusión de linfocitos T CAR dirigidos a GD2. El paciente responde lentamente a la terapia, pero desarrolla efectos secundarios molestos que incluyen fiebre, tos, erupción cutánea, dolor y neuropatía motora, todos ellos observados en terapia con anticuerpos monoclonales dirigidos contra GD2. El paciente se trató con fármacos antiinflamatorios, esteroides y analgésicos, con alivio marginal. La toxicidad de linfocitos T CAR está relacionada con un escenario de diana molecular correcta/órgano diana incorrecto, y es subagudo

y no supone una amenaza para la vida. El médico a cargo del tratamiento puede haber sido reacio a finalizar totalmente un tratamiento eficaz para un neuroblastoma que era una amenaza para la vida induciendo la apoptosis y destruyendo la totalidad de las células terapéuticas. El médico habría estado más inclinado a simplemente reducir el número de linfocitos T CAR para modular la actividad antineoplásica hasta un nivel más seguro y sostenible. En este escenario clínico, puede ser preferible un método para destruir selectivamente solamente una fracción de las células terapéuticas.

Un paciente de 52 años de edad con LMA y en segunda remisión después de quimioterapia se evaluó para un HSCT pero no se encontró donante coincidente. Se realizó un HSCT haploidéntico con selección con CD34 y reincorporación de linfocitos T BPX-501 administrados en el momento de HSCT. El Día 50 tras HSCT, el paciente desarrolló una erupción cutánea sintomática y una bilirrubina ligeramente elevada indicativa de GvHD de Gr II a III, pero ha permanecido en remisión leucémica. La toxicidad es diana molecular correcta/órgano diana incorrecto, pero es subaguda y no supone una amenaza para la vida. Si se administra AP1903 en dosis de 40 mg (0,4 mg/kg), y la GvHD se resuelve, el efecto GvL adjunto también se puede perder, haciendo que el físico sea reacio a usar la tecnología. En este caso, el médico a cargo del tratamiento puede estar más inclinado a simplemente eliminar parcialmente los linfocitos T para aliviar los síntomas de la GvHD.

Ejemplo 11: Polipéptidos de caspasa modificados para niveles controlados de apoptosis

Un reostato de caspasa que pudiera “marcar” proporciones crecientes de células eliminadas con dosis más altas del inductor químico, tal como, por ejemplo, AP1903, cumplirían mejor la necesidad clínica no satisfecha permitiendo una respuesta medida a diferentes escenarios clínicos de toxicidad en terapia celular. El uso de la tecnología de caspasa como reostato mantendría la capacidad de conseguir >90 % de destrucción rápida a una dosis completa de 0,5-1 mg/kg, permitiendo al mismo tiempo una menor destrucción clínicamente titulable a dosis más bajas (Figuras 48 y 49).

Se puede proporcionar un escalado de dosis de 0,01 a 1 mg/kg en incrementos de un periodo tan corto como 15-30 minutos mientras se puede monitorizar la respuesta a uno o más eventos adversos del paciente.

También, se puede usar una bomba de infusión continua, para iniciar una infusión de AP1903 a una dosis muy baja, y se puede aumentar lentamente incluso en incrementos de un periodo tan corto como 15-30 minutos y se puede monitorizar el evento adverso del paciente.

Adicionalmente, una formulación de liberación lenta (oral, IM, SQ, SL) de AP1903 se puede proporcionar durante varios días o semanas para conseguir lentamente el control de la toxicidad de la terapia celular subaguda que no suponga una amenaza para la vida, eliminando una proporción de las células transferidas de forma adoptiva.

Un polipéptido de caspasa modificado que comprende varias mutaciones puntuales dentro de la interfase de dimerización proteína-proteína (es decir, GCFNF⁴⁰²⁻⁴⁰⁶ en la hebra β6 de la caspasa-9 dentro de la subunidad pequeña) ((1, 2)) puede dar como resultado niveles modificados de la CI₅₀ junto con una actividad basal reducida (Figura 50).

Para modificar la señalización basal de la caspasa-9 modificada, se realizó una mutagénesis dirigida al sitio (3) basada en la PCR con la polimerasa de alta fidelidad Kapa con una tasa de error conocida de $2,8 \times 10^7$ errores/nucleótido incorporado, una fidelidad 100 veces mayor que la polimerasa Taq (Kapa Biosystems, Woburn, MA). Después de 18 ciclos de amplificación, el plásmido precursor se retiró con la enzimas de restricción *DpnI* dependiente de la metilación que deja los productos de la PCR intactos. 2 µl de la solución resultante se usaron para transformar químicamente XL1-azul o DH5α. Los mutantes positivos se identificaron posteriormente mediante secuenciación (SeqWright, Houston, TX).

Para evaluar la actividad tanto basal como mediada por AP1903, las transfecciones se realizaron en células HEK293T/16 de paso temprano (ATCC, Manassas, VA) mantenidas en IMDM, GlutaMAX™ (Life Technologies, Carlsbad, CA) suplementado con FBS al 10 %, 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomina hasta la transfección en una atmósfera de aire humidificado, 37 °C, 5 % CO₂/95 % aire. Las células en fase de crecimiento logarítmica se transfectaron transitoriamente con de 800 ng a 2 µg de plásmido de expresión que codificaba mutantes de iCasp9 y 500 ng de un plásmido de expresión que codificaba el promotor SRα impulsado por SEAP - por millón de células en tubos cónicos de 15 ml. Se utilizaron caspasa-9 catalíticamente inactiva (C285A) (sin el dominio FKBP) plásmido de expresión “vacío” (“pSH1-null”) para mantener el nivel de plásmido total constante entre transfecciones. Se usó el reactivo de transfección GeneJammer® en una proporción de 3 µl por pg de ADN plásmido para transfectar transitoriamente células HEK293T/16 en ausencia de antibióticos. 100 µl o 2 ml de la mezcla de transfección FuGENE-se añadieron a cada pocillo de una placa de 96 o 6 pocillos, respectivamente. Para el análisis SEAP, se añadieron diluciones logarítmicas de AP1903 después de una incubación mínima de 3 horas después de la transfección.

Para evaluar tanto la actividad basal como la mediada por AP1903, se realizó un ensayo de la fosfatasa alcalina secretada (SEAP). De veinticuatro a cuarenta horas tras el tratamiento con AP1903, ~100 µl de sobrenadantes se recogieron en placas de 96 pocillos y se sometieron a ensayo para analizar la actividad SEAP como se ha descrito(4, 5). En resumen, después de 45 minutos de desnaturalización térmica a 65 °C para inactivar las fosfatasas alcalinas térmicamente sensibles y endógenas (y derivadas de suero), se añadieron 5 µl de sobrenadantes a 95 µl de medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) 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 del 4-MUP por SEAP produce un sustrato

fluorescente con excitación/emisión (355/460 nm), que se puede medir fácilmente. Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos opacas negras para minimizar las “pérdidas” de fluorescencia entre pocillos.

5 La terapia celular podría incluir células que expresan una caspasa modificada de alta sensibilidad, por ejemplo, N405Q, junto con células que expresan una caspasa de baja sensibilidad, por ejemplo, F406T, lo que permite la eliminación selectiva del subconjunto más sensible al ligando conservando al mismo tiempo las células menos sensibles bajo control CID.

10 También, el paciente puede someterse a terapia celular usando dos tipos de células, por ejemplo, dos tipos de receptores de antígenos quiméricos o, por ejemplo, volver a agregar linfocitos T después del trasplante de citoblastos y la terapia CAR. En este aspecto, un conjunto de células puede expresar una caspasa modificada de alta sensibilidad, y el otro conjunto de células puede expresar una caspasa de baja sensibilidad, lo que permite la eliminación selectiva de las células después de un evento adverso. Por ejemplo, los linfocitos T que se han vuelto a agregar después del trasplante de citoblastos pueden expresar la caspasa modificada de alta sensibilidad, y las células modificadas con CAR pueden expresar la caspasa modificada de baja sensibilidad. Tras la aparición de la enfermedad del injerto vs. el hospedador, los linfocitos T se pueden eliminar mediante la administración de una dosis baja del ligando multimérico, mientras que se retienen las células terapéuticas modificadas con CAR. También, las células modificadas con CAR pueden expresar la caspasa modificada de alta sensibilidad, y los linfocitos T que se han vuelto a agregar después del trasplante de citoblastos pueden expresar la caspasa modificada de baja sensibilidad. Tras la aparición de toxicidad del órgano no diana, síndrome de lisis tumoral (TLS), síndrome de liberación de citoquinas (CRS) o síndrome de activación macrófaga (MAS), u otros resultados adversos relacionados con las células terapéuticas modificadas con CAR, estas células se pueden eliminar mediante la administración de una baja dosis del ligando multimérico. También además, un evento adverso o la enfermedad del injerto vs. el hospedador puede no estar presente en el paciente antes de su deseo de eliminar una de las poblaciones de células. Se puede necesitar una duración limitada de la terapia. Por ejemplo, puede ser eficaz continuar con la terapia de células terapéuticas modificadas con CAR durante una cantidad de tiempo limitada, a la vez que se mantienen linfocitos T que se han vuelto a agregar después del trasplante de citoblastos. En este ejemplo, las células terapéuticas modificadas con CAR expresarían la caspasa modificada de alta sensibilidad. O, por ejemplo, puede ser eficaz proporcionar linfocitos T después del trasplante de citoblastos durante una cantidad de tiempo limitada, mientras se continúa con la terapia de células terapéuticas modificadas con CAR. En este ejemplo, los linfocitos T expresarían la caspasa modificada de alta sensibilidad.

1. Chao, Y., Shiozaki, E.N., Srinivasula, S.M., Rigotti, D.J., Fairman, R., and Shi, Y. 2005. Engineering a dimeric caspase-9: a re-evaluation of the induced proximity model for caspase activation. *PLoS Biol* 3:e183.
- 35 2. Shiozaki, E.N., Chai, J., Rigotti, D. J., Riedl, S. J., Li, P., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Fairman, R., and Shi, Y. 2003. Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol Cell* 11:519-527.
3. Papworth, C., Bauer, J. C., Braman, J. and Wright, D. A. 1996. Site-directed mutagenesis in one day with >80 % efficiency. *Strategies* 9:3-4.
4. MacCorkle, R.A., Freeman, K. W., and Spencer, D. M. 1998. Synthetic activation of caspases: artificial death switches. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3655-3660.
- 40 5. Spencer, D.M., Belshaw, P.J., Chen, L., Ho, S. N., Randazzo, F., Crabtree, G.R., and Schreiber, S.L. 1996. Functional analysis of Fas signaling in vivo using synthetic inducers of dimerization. *Curr Biol* 6:839-847.

45 Ejemplo 12: Titulación del ligando inductor para evitar la enfermedad del injerto vs el hospedador

La eliminación parcial de células terapéuticas después de la terapia se puede llevar a cabo profilácticamente para evitar la aparición de un evento adverso, tal como por ejemplo, la GvHD. Los métodos utilizados para determinar el calendario y la dosificación de las células terapéuticas y del ligando inductor también se pueden usar para determinar el calendario y la dosificación de células terapéuticas y el ligando inductor para aliviar un evento adverso. Estos métodos se pueden usar para identificar la dosis más baja de ligando inductor, por ejemplo, AP1903, que preventivamente elimina los linfocitos T alorreactivos y evita la GvHD, manteniendo al mismo tiempo el mayor número de linfocitos T beneficiosos, incluidos los linfocitos T que median en la GvL. Además, dirigiéndose profilácticamente a los linfocitos T alorreactivos, se pueden administrar dosis más altas de linfocitos T al paciente, de forma que se facilita el injerto y se preserva la función inmunitaria contra la infección, al mismo tiempo que se reduce la aparición de la GvHD.

55 Un ejemplo donde se puede producir la enfermedad del injerto vs el hospedador es después del haplotrasplante mieloablativo en adultos y niños con neoplasias hematológicas. La medición de resultados terapéuticos incluye, por ejemplo, injerto, función inmunitaria y recidiva a, por ejemplo, 3, 6, 12 y 24 meses después de la terapia. Los sujetos adultos o niños que tienen neoplasias hematológicas malignas pueden someterse a haplotrasplante mieloablativo en el día 0. En los días 0-2, se administra al paciente una dosis fija de los linfocitos T que expresan la caspasa-9 inducible, un una variante de la caspasa-9 inducible. El intervalo de concentraciones de los linfocitos T que se vuelven a añadir puede ser, por ejemplo, 1×10^5 a 1×10^8 células/kg.

65 El Día 7, el ligando inductor, por ejemplo, AP1903 se administra profilácticamente. En otros ejemplos, el ligando inductor se puede administrar desde los días 3-15. La dosis inicial del inductor se redujo en, por ejemplo, media unidad logarítmica en cada cohorte de 3 pacientes hasta aparición de GvHD el día 100, que se aliviaría mediante

una segunda dosis completa AP1903. En otros métodos, la dosis inicial del inductor es una dosis baja, y aumenta en, por ejemplo, media unidad logarítmica en cada cohorte hasta que se elimina la aparición de GvHD. El intervalo de dosis del inductor puede ser, por ejemplo, de 0,01 a 0,1 microgramos/kg.

- 5 La Tabla 7 proporciona un resumen de un ejemplo de un protocolo para determinar la dosis adecuada del ligando inductor para evitar la GvHD.

Tabla 7

Día	Evento
-7 a -1	Régimen de acondicionado
0	Linfocitos T parcialmente coincidentes con reducción PBSCT
0-2	Administrar linfocitos T que expresan caspasa-9 inducible o caspasa-9 variante
7	Administrar baja dosis de AP1903
2-100—si está presente GvHD aguda o crónica	Administrar dosis completa (0,4 mg/kg) de AP1903 por infusión
Seguimiento 3, 6, 12, 24 meses	Evaluar el injerto; reconstitución inmunitaria; recidiva

10

Ejemplo 13: Ejemplos de ácidos nucleicos y secuencia de ácidos nucleicos concretas

Id. de sec. n.º: 1, secuencia de nucleótidos de la secuencia LTR en 5'

15 TGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGAAGGCATGGAAAAATACATAAC
 TGAGAATAGAAAAGTTCAGATCAAGGTCAGGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTG
 GTAAGCAGTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGT
 GGTAAGCAGTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTT
 20 CTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAAT
 CAGTTTCGCTTCTCGCTTCTGTTTCGCGCGCTTATGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCACAACCCCTCACTCG
 GGGCGCCAGTCCCTCCGATTGACTGAGTCGCCCCGGGTACCCGTGTATCCAATAAACCCCTCTTGCAGTTGCATCCG
 ACTTGTGGTCTCGCTGTTCCCTTGGGAGGGTCTCTGAGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCA

25 Id. de sec. n.º: 2, secuencia de nucleótidos de F_v (FKBP12v36 humana)

25 GGAGTGCAGGTGGAAACCATCTCCCCAGGAGACGGGCGCACCTTCCCCAAGCGCGGCCAGACCTGCGTGGT
 GCACTACACCGGGATGCTTGAAGATGGAAAGAAAGTTGATTCCTCCCGGGACAGAAACAAGCCCTTTAAGTTT
 ATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCGAGGCTGGGAAGAAGGGGTTGCCAGATGAGTGTGGGTGAGAGAGC
 30 CAAACTGACTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCATCATCCACCACATGCCACT
 CTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAACTGGAA

Id. de sec. n.º: 3, secuencia de aminoácidos de F_v (FKBP12v36 humana)

35 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

Id. de sec. n.º: 4, secuencia de nucleótidos del enlazador GS

40 TCTGGCGGTGGATCCGGA

Id. de sec. n.º: 5, secuencia de aminoácidos del enlazador GS

45 S G G G S G

Id. de sec. n.º: 6, secuencia de nucleótidos del enlazador (entre el enlazador GS y Casp 9)

50 GTCGAC

Id. de sec. n.º: 7, secuencia de aminoácidos del enlazador (entre el enlazador GS y Casp 9)

VD

Id. de sec. n.º: 8, secuencia de nucleótidos de Casp 9 (truncada)

GGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGAGTTTGGAGGGAAATGCAGATTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGC
 CCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAACCTTGGCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCCTGGCTC
 CAACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCTCTCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCT
 GACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCAGCAGGACCACGGTGTCTGGACTGCTGCGT
 5 GGTGGTCATTCTCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG
 ATGCCCTGTGTCGGTTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGAAGCC
 CAAGCTCTTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTGGAGGTGGCCTCCACTTCCCCT
 GAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCCGTTCCAGGAAGTTTGGAGACCTTCGAC
 CAGCTGGACGCCATATCTAGTTTCCCACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTTTCCAGGTTTTGT
 10 TTCCTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCA
 CTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCCGGTCAAAGGGATTATAAACAGATG
 CCTGGTTGCTTAAATTTCTCCGGAATAAACTTTTCTTTAAACATCA

Id. de sec. n.º: 9, secuencia de aminoácidos de caspasa-9 (truncada) con el dominio CARD eliminado

GFGDVGALESLRGNADLAYILSMPECGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRR
 RFSSLHFMVEVKGDLTAKKMLLALLELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPGA
 VYGTGCPVSVKEIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSPEDES
 PGSNPEPDATEPFQEGRLTFDQLDAISSLPDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYV
 20 ETLLDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTS

Id. de sec. n.º: 10, secuencia de nucleótidos del enlazador (entre caspasa-9 y 2A)

GCTAGCAGA

Id. de sec. n.º: 11, secuencia de aminoácidos del enlazador (entre caspasa-9 y 2A)

ASR

Id. de sec. n.º: 12, secuencia de nucleótidos del precursor de la proteína de la cápsida del virus 2A de *Thosea* asigna

GCCGAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATCCCGGGCCC

Id. de sec. n.º: 13, secuencia de aminoácidos del precursor de la proteína de la cápsida del virus 2A de *Thosea* asigna

A E G R G S L L T C G D V E E N P G P

Id. de sec. n.º: 14, secuencia de nucleótidos de CD19 humano (dominio citoplásmico Δ) (dominio transmembrana en negrita)

ATGCCACCTCCTCGCCTCCTCTTCTTCTCCTCCTCTTCCCTCACCCCCATGGAAGTCAGGCCCGAGGAACCTCTAG
 TGGTGAAGGTGGAAGAGGGAGATAACGCTGTGCTGCAGTGCCTCAAGGGGACCTCAGATGGCCCCACTCAGC
 AGCTGACCTGGTCTCGGGAGTCCCGCTTAAACCCTTCTTAAAACTCAGCCTGGGGCTGCCAGGCCTGGGAA
 45 TCCACATGAGGCCCTGGCCATCTGGCTTTTTCATCTTCAACGCTCTCTCAACAGATGGGGGGCTTCTACCTGTG
 CCAGCCGGGGCCCCCTCTGAGAAGGCTGGCAGCCTGGCTGGACAGTCAATGTGGAGGGCAGCGGGGAG
 CTGTTCCGGTGAATGTTTTCGGACCTAGGTGGCCTGGGCTGTGGCCTGAAGAACAGGTCTCAGAGGGCCCC
 AGCTCCCCTTCCGGGAAGCTCATGAGCCCAAGCTGTATGTGTGGGCCAAAGACCGCCCTGAGATCTGGGAG
 GGAGAGCCTCCGTGTCTCCACCGAGGGACAGCCTGAACCAGAGCCTCAGCCAGGACCTCACCATGGCCCC
 TGGCTCCACACTCTGGCTGTCTGTGGGTAACCCCTGACTCTGTGTCCAGGGGCCCTCTCCTGGACCCA
 50 TGTGCACCCCAAGGGGCCAAGTCATTGCTGAGCCTAGAGCTGAAGGACGATCGCCCGCCAGAGATATGTG
 GGTAATGGAGACGGGTCTGTTGTTGCCCGGGCCACAGCTCAAGACGCTGAAAAGTATTATTGTCACCGTGG
 CAACCTGACCATGTATTCCACCTGGAGATCACTGCTCGGCCAGTACTATGGCACTGGCTGCTGAGGACTGGT
 GGCTGGAAG**GTCTCAGCTGTGACTTTGGCTTATCTGATCTTCTGCCTGTGTTCCCTTGTGGGCATTCTTCATC
 TTCAAAGAGCCCTGGTCTGAGGAGGAAAAGAAAGCGAATGACTGACCCACCCAGGAGATTC**

Id. de sec. n.º: 15, secuencias de aminoácidos de CD19 humana (dominio citoplásmico Δ)

MPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTS DGP TQQLTWSRES
 PLKPFLLKLSLGLPLGLIHMRLAIWLFIFNVSSQMGGFYLCQP GPPSEKAWQPGWT
 60 VNVEGSGELFRWNVSDLGLGLGCLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIW
 EGEPCLPPRDSLNSLSQDLTMAPGSTLWLS CGVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGP
 KSLLSLELKDDRPARDMWMETGLLLPRATAQDAGKYYCHRGNL TMSFHLEITARP
 VLWHWLLRTGGWKVSAVTLAYLIFCLCSLVGILHLQRALVLRKRKRMTDPTRRF

Id. de sec. n.º: 16, secuencia de nucleótidos de LTR en 3'

TGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAAGTAACGCCATTTTGAAGGCATGGAAAAATACATAAC
 TGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTCAGGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTG
 GTAAGCAGTTCCTGCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGT
 5 GGTAAGCAGTTCCTGCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTT
 CTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAAT
 CAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTTCGCGCGCTTCTGCTCCCAGCTCAATAAAAGAGCCCAACCCCTCACTCG
 GGGCGCCAGTCCCGATTGACTGAGTCGCGCGGTAACCCGTGTATCCAATAAACCCCTCTTGCAGTTGCATCCG
 ACTTGTGGTCTCGCTGTTCTTGGGAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCA

10 Id. de sec. n.º: 17, Vector de expresión y secuencia de nucleótidos - secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica y las secuencias de LTR en 5' y 3' LTR y secuencia del vector adicional.

TGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAAGTAACGCCATTTTGAAGGCATGGAAAAATACATAACTG
 AGAATAGAAAAGTTCAGATCAAGGTCAGGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAG
 15 CAGTTCCTGCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGC
 AGTTCCTGCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACC
 ATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTC
 GCTTCTGTTTCGCGCGCTTATGCTCCCAGCTCAATAAAAGAGCCCAACCCCTCACTCGGGCGCCAGTCCCTCC
 GATTGACTGAGTCGCCCCGGTACCCGTGTATCCAATAAACCCCTCTTGCAGTTGCATCCGACTTGTGGTCTCGCTGTT
 20 CTTGGGAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGCTTTTCATTTGGGGCTCGTCCGGGATCG
 GGAGACCCCTGCCAGGGACCCAGCCACCCAGCCGAGGTAAGCTGGCCAGCACTTATCTGTGTCTGTCCGA
 TTGTCTAGTGTCTATGACTGATTTTATGCGCCTGCGTCCGTAAGTACTAGCTAAGTACTAGCTCTGTATCTGGCGGACCC
 GTGGTGGAACTGACGAGTTCGGAACACCCGGCCGCAACCCTGGGAGACGTCCAGGGACTTCGGGGGCGCTTTTT
 GTGGCCGACCTGAGTCTAAATCCCAGTCTTTAGGACTCTTGGTGCACCCCCCTTAGAGGAGGGATATGTGG
 25 TTCTGGTAGGAGACGAGAACCTAAACAGTTCGCGCCTCCGTCTGAATTTTTGCTTTTCGTTTGGGACCGAAGCCGC
 GCCGCGCTCTGTCTGCTGCAGCATCGTTCTGTGTTGTCTCTGTCTGACTGTGTTTCTGTATTTGTCTGAAAATATG
 GGCCCGGCTAGCCTGTTACCCTCCCTTAAAGTTTACCTTAGGTCAGTGGAAAGATGTCGAGCGGATCGCTCACA
 ACCAGTCGGTAGATGTCAAGAAGAGACGTTGGGTTACCTTGTCTGCTGCAAGATGGCCAACCTTTAACGTCGGATGG
 CCGCGAGACGGCACCTTTAACCGAGACCTCATACCCAGGTTAAGATCAAGGCTTTTTACCTGGCCCGCATGGAC
 30 ACCCAGACCAGGTGGGGTACATCGTACCTGGGAAGCCTTGGCTTTTACCCTCCCTGGGTCAAGCCCTTTGT
 ACACCCTAAGCCTCCGCTCCTCTTCCATCCGCCCGTCTCTCCCTTGAACCTCCTCGTTCGACCCCGCCTC
 GATCCTCCCTTATCCAGCCCTCACTCCTTCTTAGGCGCCCCATATGGCCATATGAGATCTTATATGGGGCACCC
 CCGCCCTTGTAAACTTCCCTGACCTGACATGACAAGAGTTACTAACAGCCCTCTCTCCAAGCTCACTTACAGGC
 TCTCTACTTAGTCCAGCACGAAGTCTGGAGACCTTGCGCGCACCTACCAAGAACAACCTGAGCCGACCCGTTGGTA
 35 CCTCACCTTACCAGTCCGCGACACAGTGTGGTCCGCGACACCAAGTACTAGGAACTAGAACCTCGCTGGAAAG
 GACCTTACACAGTCTGCTGACCAACCCACCCCTCAAAGTACAGCGCATCGCAGCTTGGATACACCGCCGCA
 CGTGAAGGCTGCCGACCCCGGGGTGGACCATCCTCTAGACTGCCATGCTCGAGGGAGTGCAGGTGGAACCATC
 TCCCCAGGAGACGGGCGCACCTTCCCCAAGCGCGGCCAGACCTGCGTGGTGCCTACACCCGGGATGCTTGAAGAT
 GGAAGAAAGTTGATTCTCCCGGACAGAAACAAGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCGAG
 40 GCTGGGAAGAGGGGTTGCCAGATGAGTGTGGTTCAGAGAGCCAAACTGACTATATCTCCAGATTATGCCTATGG
 TGCCACTGGGCACCCAGGCATCATCCCACCACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAACTGGAATCTG
 GCGGTGGATCCGGAGTCCGACGGATTTGGTGTGCTGCTTGTAGAGTGGAGGAAATGCAGATTTGGCTTCA
 CATCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAACCTTCTGCCGTGAGTCCGGCTCCG
 ACCCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCCGTTCTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGA
 45 AGGGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCAGCAGGACCACGGTGTCTGGACT
 GCTGCGTGGTGGTCACTCTCTCACGGTGTGAGGCCAGCCACCTGCAGTTCAGGGGCTGTCTACGGCACAG
 ATGGATGCCCTGTGTCCGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGAAGC
 CCAAGCTCTTTTTATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTGGAGTGGCCTCCACTTCCCCTGA
 AGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCGTTCCAGGAAGGTTTGGAGACCTTCGACCAGCT
 50 GGACGCCATATCTAGTTTGGCCACACCCAGTACATCTTTGTCTTACTCTACTTTCCAGGTTTTGTTTTCTGGAG
 GGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAGACCTG
 CAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTGGTGAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAATTTCT
 CTCCGAAAAAACTTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAGCCGAGGGCAGGGGAAGTCTTCAACATGCGGGGACG
 TGGAGGAAAAATCCCGGGCCATGCCACCTCCTCGCCTCCTCTTCTCCTCCTCCTCCTCACCCCATGGAAGTCAG
 55 GCCCGAGGAACCTCTAGTGGTGAAGGTGGAAGAGGGAGATAACGCTGTGCTGCAGTGCCTCAAGGGGACCTCAGA
 TGGCCCCACTCAGCAGCTGACCTGGTCTCGGGAGTCCCCTTAAACCTTCTTAAACTCAGCCTGGGGTCCCA
 GGCTGGGAATCCACATGAGGCCCTGGCCCTGTGCTTTTTCATTTCAACGCTCTCTCAACAGATGGGGGCTTCT
 ACCTGTGCCAGCCGGGGCCCCCTCTGAGAAGGCCTGGCAGCCTGGCTGGACAGTCAATGTGGAGGGCAGCGGG
 GAGCTGTTCCGGTGAATGTTTCCGACCTAGGTGGCCTGGGCTGTGGCCTGAAGAACAGGTCTCAGAGGGCCCC
 60 AGCTCCCTTCCGGGAAGCTCATGAGCCCCAAGCTGTATGTGTGGCCAAAGACCCGCTGAGATCTGGGAGGGA
 GAGCCTCCGTGTCTCCACCGAGGGACAGCCTGAACCAGAGCCTCAGCCAGGACCTCACCATGGCCCTGGCTCC
 AACTCTGGCTGTCTGTGGGTACCCCTGACTCTGTGTCCAGGGGCCCCCTCTCCTGGACCCATGTGCACCCCA
 AGGGTTCATAAGTCAATTGCTAGCCCTAGAGCTAAGGACGATCGCCCGCCAGAGATATGTGGTAATGGAGACCG
 GTCTGTTGTTGCCCGGCCACAGCTCAAGACGCTGGAAGATTATTGTCACCGTGGCAAGTCACTGATGTCATTC
 65 CACTGGAGATCACTGCTCGGCCAGTACTATGGCACTGGCTGTGAGGACTGGTGGCTGGAAGGTTCTCAGCTGTG
 ACTTTGGCTTATCTGATCTTCTGCCTGTGTTCCCTTGTGGGCACTTTCATCTTCAAGAGCCCTGGTCTGAGGAGG

AAAAGAAAGCGAATGACTGACCCACCAGGAGATTCTAACCGTTCATCATCGATCCGGATTAGTCCAATTTGTTAAA
 GACAGGATATCAGTGGTCCAGGCTCTAGTTTTGACTCAACAATATCACCAGCTGAAGCCTATAGAGTACGAGCCATA
 GATAAAATAAAGATTTTATTTAGTCTCCAGAAAAAGGGGGAATGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAG
 5 CTTAAGTAACGCCATTTTGAAGGCATGGAAAAATACATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTCAGGAACA
 GATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAG
 ATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGA
 TGGTCCCCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCAAGGACCTG
 AAATGACCCTGTGCCTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTTCGCGCGCTTCTGCTCCCGAGCT
 10 CAATAAAAGAGCCCACAACCCCTCACTCGGGGCGCCAGTCTCCGATTGACTGAGTCGCCCGGGTACCCGTGTATC
 CAATAAACCCCTCTTGCAGTTGCATCCGACTTGTGGTCTCGCTGTTCCCTGGGAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTA
 CCCGTGACGCGGGGTCTTTCACACATGCAGCATGTATCAAAATTAATTTGGTTTTTTTTCTTAAGTATTTACATTAAT
 GGCCATAGTACTTAAAGTTACATTTGGCTTCTTGAATAAACATGGAGTATTCAGAATGTGCATAAATATTTCTAAT
 TTAAGATAGTATCCATTTGGCTTTTCTACTTTTTCTTTATTTTTTTTGTCCCTGTCTTCCATTTGTTGTTGTTGTTG
 15 TTGTTTGGTTTGGTTGGTTGGTTGTTAATTTTTTTTTAAAGATCTTACACTATAGTTACAGACTATTAGTACTAC
 TCTGTAACCCAGGGTGACCTTGAAGTCATGGGTAGCCTGCTGTTTTAGCCTCCACATCTAAGATTACAGGTATGA
 GCTATCATTTTTGGTATATTGATTGATTGATTGATTGATGTGTGTGTGTGATTGTGTTTGTGTGTGTGACTGTGAAA
 ATGTGTGTATGGGTGTGTGTGAATGTGTGTATGTATGTGTGTGTGTGAGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
 TGTGTGACTGTGTCTATGTGTATGACTG
 AAAAAATATTCTATGGTAGTGAGAGCCAACGCTCCGGCTCAGGTGTCAGGTTGGTTTTGAGACAGAGTCTTTCACTT
 20 AGCTTGGAAATTCAGTGGCCGCTGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCAATTAATCGCCCTG
 CAGCAGATCCCCCTTTCCGAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCGACCCGATCGCCCTCCCAACAGTTGCGCA
 GCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGATATTGGTGC
 ACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCT
 GACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGACAGGTT
 25 TTCACCGTCATCACCGAAACGCGCGATGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATA
 ATAATGGTTTTCTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTTCTAATA
 CATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCGTATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGTATGAGTA
 TTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTTGGCGCATTTTGCCTTCCCTGTTTTTGTCCACCCAGAAACGCTGGT
 GAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACACGCGTAAGATC
 30 CTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCC
 CGTATTGACGCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGT
 CACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAACACTG
 CGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTA
 ACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAG
 35 CAATGGCAACAAGTTGCGCAAACTATAACTGGCGAACTACTTACTGTAGCTTCCCGCAACAATTAATGAACTGGA
 TGAGGCGGATAAAGTTGCGAGGACCACTTCTGCGCTCGCCCTTCCGGCTGGTGTATTTAGCTGATAAACTGCG
 AGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATC
 TACACGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGC
 ATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAG
 40 GTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTA
 GAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACCACCGCTA
 CCAGCGGTGGTTTTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCACTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCCAGCAGAGCGCAGAT
 ACCAAACTGCTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGCCACCACCTTCAAGAAGTCTGTAGCACCCTACATACCTCG
 45 CTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAG
 TTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTAC
 ACCGAAGTGAATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTAT
 CCGGTAAGCGGACGGGTCGGAACAGGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGT
 CCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAA
 ACGCCAGCAACGCGGCCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTGCTGGCCTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCC
 50 CTGATTCTGTGGAATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAAGTGTAGTACCGCTCGCCGACGCCGAACGACCGCAG
 CGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTA
 ATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACT
 CATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTAC
 ACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTTGCTCTTAGGAGTTTCTAATACATCCCAAACCTCAAATATAT
 55 AAAGCATTGACTTGTCTATGCCCTAGGGGGCGGGGGGAAGCTGAAGCCAGCTTTTTTAACTTTAAAATGTTAATT
 CCATTTAAATGACACAGATGTTTTATTTTATAAGGTTTTCAATGTGCATGAATGCTGCAATATTCCTGTTACCAAAGC
 TAGTTATAAATAAATAAAGTAAACGTTGAAATTAAGTTTCTAGATTCTGTCATTAAACGTTTCCCTCAGTTGACAACATA
 AATGCGCTGCTGAGCAAGCCAGTTTGCATCTGTGAGGATCAATTTCCCATATGCCAGTCATATTAATTACTAGTCAA
 60 TTAGTTGATTTTTATTTTTGACATATACATGTGAA

Id. de sec. n.º: 18, (secuencia de nucleótidos de F_vF_vls con enlazadores XhoI/Sall, (codones inestables en minúscula en F_v))

ctcgagGGcGTcCAaGTcGAaACcAttagtCCcGGcGAtGGcaGaAcATtCctAAaaGgGGaCAaAcATgTgTcGtCcAtTAtAcGg
 65 GcATGtTgGAgGAcGGcAAaAAgGTgGAcagtagtaGaGAtcGcAAtAAaCCtTTcAAaTTcATGtTgGGaAAaCAaGAaGtATtGg
 gGGaTGGGAgGAgGGcGTgGcCAaATGtccGTcGGcCAacGcGcTAaGCTcACcATcagcCCcGAcTAcGCaTAcGGcGcTAcC

GGaCAtCCcGGaATtATtCCcCCtCAcGCtAcCtTgGTgTTtGAcGtCgAaCTgtTgAAgCTcGAagtcgagggagtgaggtggaaccatct
 ccccaggagacgggocgacccctcccaagcgcggccagacctgcgtgggtgactacaccgggatgctgaagatggaagaaagttgattcctccgggacagaaaca
 agcccttaagttatgctaggaagcaggaggtgatccgaggtggaagaaggggtgccagatgagtggtgagagaccaaactgactatatactccagattatgc
 ctatggtgccactgggacccaggcatcatccaccacatgccactctcgtctgatgtggagcttctaaaactggaatctggcggtgatccggagtcgag

5 Id. de sec. n.º: 19, (secuencia de aminoácidos F_VF_{VLs})

GlyValGlnValGluThrIleSerProGlyAspGlyArgThrPheProLysArgGlyGlnThrCysValValHisTyrThrGlyMetLeuGluAspGly
 LysLysValAspSerSerArgAspArgAsnLysProPheLysPheMetLeuGlyLysGlnGluValIleArgGlyTrpGluGluGlyValAlaGlnM
 etSerValGlyGlnArgAlaLysLeuThrIleSerProAspTyrAlaTyrGlyAlaThrGlyHisProGlyIleIleProProHisAlaThrLeuValPheA
 spValGluLeuLeuLysLeuGlu(ValGlu)

10

GlyValGlnValGluThrIleSerProGlyAspGlyArgThrPheProLysArgGlyGlnThrCysValValHisTyrThrGlyMetLeuGluAspGly
 LysLysValAspSerSerArgAspArgAsnLysProPheLysPheMetLeuGlyLysGlnGluValIleArgGlyTrpGluGluGlyValAlaGlnM
 etSerValGlyGlnArgAlaLysLeuThrIleSerProAspTyrAlaTyrGlyAlaThrGlyHisProGlyIleIleProProHisAlaThrLeuValPheA
 spValGluLeuLeuLysLeuGlu-SerGlyGlyGlySerGly

15

Id. de sec. n.º: 20, FKBP12v36 (res. 2—108)

20 **Enlazador SGGGSG (6 aa)**

ΔCasp9 (res. 135—416)

ATGCTCGAGGGAGTGCAGGTGGAgAcTATCTCCCCAGGAGACGGGCGCACCTTCCCCAAGCGCGGCCAGACCTG
 CGTGGTGCACCTACCCGGGATGCTTGAAGATGGAAGAAAGTTGATTCCCTCCCGGGACAGAAACAAGCCCTTTAA
 GTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCGAGGCTGGGAAGAAGGGGTTGCCAGATGAGTGTGGGTGAGAGAG
 CCAAATGACTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCATCATCCACCACATGCCACTCT
 CGTCTTCGATGTGAGCTTCTAAAACCTGGAATCTGGCCGGTGGATCCCGAGTCGACGGATTGGTGTGATGTCGGTGC
 TCTTGAGAGTTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATC
 AACAATGTGAACCTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTTGCGG
 CGTCCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGTGCTGGCTTTG
 CTGGAGCTGGCGCgGCAGGACCACGGTGTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTGCATTCTCTCACGGCTGTCAGGC
 CAGCCACCTGCAGTTCACAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGTCCGGTTCGAGAAGATTGTGAACAT
 CTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGAAAGCCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGC
 AGAAAGACCATGGGTTTGGAGGTGGCCTCCACTCCCTGAAGACGAGTCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGAT
 GCCACCCCGTTCCAGGAAGTTTTGAGGACCTTCGACCCAGCTGGAGCCCATATCTAGTTTTGCCACACCCAGTGAC
 ATCTTTGTCTACTCTACTTTCCAGTTTTGTTTCTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGA
 CCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTG
 TTTCCGTGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTAATTTCTCCGGAAAAAATTTTTCTTTAAACATCA

25

30

35

40 Id. de sec. n.º: 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

45 Id. de sec. n.º: 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 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 M P G C F N F L R K K L F F K T S

50

55 Id. de sec. n.º: 23, ΔCasp9 (res. 135—416) D330A, secuencia de nucleótidos

GGATTTGGTGTATGTCGGTGTCTCTTGAAGTTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGC
 CCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAACCTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTC
 CAACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTGCCTTCTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCT
 GACTGCCAAGAAAATGGTGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCgGCAGGACCACGGTGTCTGGACTGCTGCGT
 GGTGGTGCATTCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCACAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG
 ATGCCCTGTGTCCGGTTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGAAAGCC
 CAAGCTCTTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTTGAGGTGGCCTCCACTTCCCTC
 GAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCCGTTCCAGGAAGTTTTGAGGACCTTCGCAC
 CAGCTGGCCCATATCTAGTTTTGCCACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTTTCCAGGTTTTGT
 TTCTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCA

60

65

CTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAGATG
CCTGGTTGCTTT**AAT**TCCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAACATCA

Id. de sec. n.º: 24, ΔCasp9 (res. 135—416) D330A, secuencia de aminoácidos

5
GFGDVGALESRLGNADLAYILSMPECGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRR
RFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELARQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPGA
VYGTGCPVSVVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFVASTSPEDES
10 PGSNPEPDATPFQEGRLRTFDQLAAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVE
TLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTS

Id. de sec. n.º: 25, ΔCasp9 (res. 135-416) secuencia de nucleótidos de N405Q

15 GGATTTGGTGATGTCCGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGC
CCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAACCTTCCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTC
CAACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTGCCTTCTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCT
GACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGTGTCTGGACTGCTGCGT
GGTGGTCATTCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCAGGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG
20 ATGCCCTGTGTCGGTTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGAAGCC
CAAGCTCTTTTTATCCAGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTGGAGGTGGCTCCACTTCCCCT
GAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGGAGACCTTCGAC
CAGCTG**GAC**CCCATATCTAGTTTGGCCACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTTTCCAGGTTTTGT
TTCCTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCA
25 CTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAGATG
CCTGGTTGCTTT**CAG**TCCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAACATCA

Id. de sec. n.º: 26, ΔCasp9 (res. 135-416) secuencia de aminoácidos N405Q

30 GFGDVGALESRLGNADLAYILSMPECGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRR
RFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELARQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPGA
VYGTGCPVSVVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFVASTSPEDES
PGSNPEPDATPFQEGRLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYV
ETLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFQFLRKKLFFKTS

35 Id. de sec. n.º: 27, ΔCasp9 (res. 135-416) secuencia de nucleótidos de D330A N405Q

GGATTTGGTGATGTCCGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGC
CCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAACCTTCCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTC
40 CAACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTGCCTTCTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCT
GACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGTGTCTGGACTGCTGCGT
GGTGGTCATTCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCAGGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG
ATGCCCTGTGTCGGTTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGAAGCC
CAAGCTCTTTTTATCCAGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTGGAGGTGGCTCCACTTCCCCT
45 GAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGGAGACCTTCGAC
CAGCTG**CCC**CCCATATCTAGTTTGGCCACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTTTCCAGGTTTTGT
TTCCTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCA
CTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAGATG
CCTGGTTGCTTT**CAG**TCCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAACATCA

50 Id. de sec. n.º: 28, ΔCasp9 (res. 135-416) secuencia de aminoácidos de D330A N405Q

GFGDVGALESRLGNADLAYILSMPECGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRRR
FSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELARQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPGA
YGTGCPVSVVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFVASTSPEDESP
55 GSNPEPDATPFQEGRLRTFDQLAAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVET
LDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFQFLRKKLFFKTS

Id. de sec. n.º: 29, secuencia de nucleótidos de FKBPv36 (Fv1)

60 GGCGTTCAAGTAGAAACAATCAGCCCAGGAGACGGAAGGACTTTCCCAAACGAGGCCAAACATGCGTAGTT
CATTATACTGGGATGCTCGAAGATGGAAGGAGTAGATAGTAGAGACCGAAACAAACATTTAAATTTAT
GTTGGGAAAACAAGAAGTAATAAGGGGCTGGGAAGAAGGTGTAGCACAATGTCTGTTGGCCAGCGCGCAA
ACTCACAATTTCTCCTGATTATGCTTACGGAGCTACCGGCCACCCCGGCATCATACCCCTCATGCCACACTG
65 GTGTTTGACGTGCAATTGCTCAAACCTGGAA

Id. de sec. n.º: 30, secuencia de aminoácidos de FKBPv36 (Fv1)

ES 2 791 598 T3

GVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKPFK FMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGRRAKL
TISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVDFVELLKE

5 Id. de sec. n.º: 31, secuencia de nucleótidos de FKBPv36 (Fv2)

GGaGTgCAgGTgGAgACgATtAGtCCtGGgGAtGGgAGaACcTTtCCaAAgCGcGGtCAgACcTgTGTtGtCcAcTAcAcC
GGtATGCTgGAgGAcGGgAAgAGGTgGActcTtcacGcGAtCGcAAtAAgCCtTTcAAgTTcATGcTcGGcAAgCAGgAGG
10 TgATccGGGGgTGGGAgGAgGGcGTgGcTcAgATGTCgGTcGGgCAaCGaGCgAAgCTtACcATcTCaCCcGAcTAcG
CgTAtGGgGCaACgGGgCAcCCgGgATtATcCCtCCcCAcGCtACgCTcGTaTTcGAtGTgGAgcTcttAAgCTtGag

Id. de sec. n.º: 32, secuencia de aminoácidos de FKBPv36 (Fv2)

15 GVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKPFK FMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGRRAKL
TISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVDFVELLKE

Id. de sec. n.º: 33, secuencia de nucleótidos de ΔCD19

20 ATGCCCCCTCCTAGACTGCTGTTTTCTGCTCTTTCTCACCCCAATGGAAGTTAGACCTGAGGAACCACTGGT
CGTTAAAGTGGAAGAAGGTGATAATGCTGTCTCCAATGCCTTAAAGGGACCGACGGACCAACCGCAGCA
ACTGACTTGGAGCCGGGAGTCCCCTCTCAAGCCGTTTCTCAAGCTGTCACTTGGCCTGCCAGGTCTTGGTATT
CACATGCGCCCCCTTGGCATTGGCTCTTCATATTCAATGTGTCTCAACAAATGGGTGGATTCTACCTTTGCCA
GCCCGCCCCCTTCTGAGAAAGCTTGGCAGCCTGGATGGACCGTCAATGTTGAAGGCTCCGGTGAGCTGTT
25 TAGATGGAATGTGAGCGACCTTGGCGGACTCGGTTGCGGACTGAAAAATAGGAGCTCTGAAGGACCCCTTCT
CCCTCCGTAAGTTGATGTACCTAAGCTGTACGTGTGGCCAAGGACCGCCCCGAAATCTGGGAGGGCGAG
CCTCCATGCCTGCCGCTCGCGATTCACTGAACCAGTCTCTGTCCAGGATCTCACTATGGCGCCCGGATCTA
CTCTTTGGCTGTCTTGGCGGTTCCCCCAGATAGCGTGTCAAGAGGACCTCTGAGCTGGACCCACGTACACC
CTAAGGGCCCTAAGAGCTTGTGAGCCTGGAAGTGAAGGACGACCCCGCAGCGATATGTGGGTAATGG
30 AGACCGCCTTCTGCTCCCTCGCGCTACCGCACAGGATGCAGGGAAATACTACTGTCAATAGGGGAATCTGA
CTATGAGCTTTTCATCTCGAAATTACAGCACGGCCCGTTCTTTGGCATTGGCTCCTCCGACTGGAGGCTGGAA
GGTGTCTGCCGTAACACTCGCTTACTTGAATTTTTGCCTGTGTAGCCTGGTTGGGATCCTGCATCTTACGCGAG
CCCTTGATTGCGCCGAAAAGAAAACGAATGACTGACCCTACACGACGATTCTGA

Id. de sec. n.º: 34, secuencia de aminoácidos de ΔCD19

35 MPPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESPLKPFLLKLSLGLPGLGIHMR
PLAIWLFIFNVSQQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSGELFRWNVSDLGGLGCLKNRSSEGPSSPSGK
LMSPKLYVWAKDRPEIWEGEPPCLPPRDSLNLQSLSQLTMAPGSTLWLSGCVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGPKS
40 LLSLELKDDRPARDMWVVMETGLLLPRATAQDAGKYCHRNLMSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWKVSAVTLAY
LIFCLCSLVGILHQRALVLRKRKRMTDPTRRF*

Secuencia con optimización de codones de iCasp9-N405Q-2A-ACD19: (el .co que sigue al nombre de una
secuencia de nucleótidos indica que tiene optimización de codones (o la secuencia de aminoácidos codificada
mediante la secuencia de nucleótidos de con optimización de codones).

45 Id. de sec. n.º: 35, secuencia de nucleótidos de FKBPv36.co (Fv3)

ATGCTGGAGGGAGTGCAGGTGGAGACTATTAGCCCCGGAGATGGCAGAACATTCCCCAAAAGAGGACAGACT
TGCGTCGTGCATTATACTGGAATGCTGGAAGACGGCAAGAAGGTGGACAGCAGCCGGGACCGAAACAAGCCC
50 TTCAAGTTCATGCTGGGGAAGCAGGAAGTATCCGGGGCTGGGAGGAAGGAGTCCGACAGATGTCAGTGGG
ACAGAGGGCCAAACTGACTATTAGCCCAGACTACGCTTATGGAGCAACCGGCCACCCCGGGATCATTCCCC
TCATGCTACACTGGTCTTCGATGTGGAGCTGCTGAAGCTGGAA

Id. de sec. n.º: 36, secuencia de aminoácidos de FKBPv36.co (Fv3)

55 MLEGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKPFK FMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGO
RAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVDFVELLKE

Id. de sec. n.º: 37, secuencia de nucleótidos de Enlazador.co

60 AGCGGAGGAGGATCCGGA

Id. de sec. n.º: 38, secuencia de aminoácidos de Enlazador.co

65 SGGGSG

ES 2 791 598 T3

Id. de sec. n.º: 39, secuencia de nucleótidos de caspasa-9.co

5 GTGGACGGGTTTGGAGATGTGGGAGCCCTGGAATCCCTGCGGGGCAATGCCGATCTGGCTTACATCCTGTCT
 ATGGAGCCTTGC GGCCACTGTCTGATCATTAAACAATGTGAACCTTGCAGAGAGAGCGGGCTGCGGACCAGA
 ACAGGATCCAATATTGACTGTGAAAAGCTGCGGAGAAGGTTCTCTAGTCTGCACTTTATGGTCGAGGTGAAAAG
 GCGATCTGACCGCTAAGAAAATGGTGTCTGGCCCTGCTGGAAGTGGCTCGGCAGGACCATGGGGCACTGGATT
 GCTGCGTGGTTCGTGATCCTGAGTCACGGCTGCCAGGCTTACATCTGCAGTTCCCTGGGGCAGTCTATGGAA
 CTGACGGCTGTCCAGTCAGCGTGGAGAAGATCGTGAACATCTTCAACGGCACCTCTTGCCCAAGTCTGGGCG
 10 GGAAGCCCAAAGTGTCTTTATTTCAGGCCTGTGGAGGCGAGCAGAAAAGATCACGGCTTCGAAGTGGCTAGCA
 CCTCCCCGAGGACGAATCACCTGGAAGCAACCCTGAGCCAGATGCAACCCCTTCCAGGAAGGCCTGAGGA
 CATTGACAGCTGGATGCCATCTCAAGCCTGCCACACCTTCTGACATTTTCGTCTTTACAGTACTTTCCCT
 GGATTTGTGAGCTGGCGGATCCAAAGTCAGGCAGCTGGTACGTGGAGACACTGGACGATATCTTTGAGCAG
 TGGGCCATTCTGAAGACCTGCAGAGTCTGCTGCTGCGAGTGGCCAATGCTGTCTCTGTGAAGGGGATCTAC
 15 AACAGATGCCAGGATGCTTCCAGTTTCTGAGAAAAGAACTGTTCTTTAAGACCTCCGCATCTAGGGCC

Id. de sec. n.º: 40, secuencia de aminoácidos de caspasa-9.co

20 VDFGFDVGALESLRGNADLAYILSMPCGHCLINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEVKGDLTA
 KKMVLALLELARQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGTGDCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQA
 CGGEQKDHGFEVASTPEDESPGSNPEPDATPFQEGLRFTDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGS
 WYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFQFLRKKLFFKTSASRA

Id. de sec. n.º: 41, secuencia de nucleótidos de Enlazador.co

25 CCGCGG

Id. de sec. n.º: 42, secuencia de aminoácidos de Enlazador.co

30 PR

Id. de sec. n.º: 136: Secuencia de nucleótidos de T2A.co

GAAGGCCGAGGGAGCCTGCTGACATGTGGCGATGTGGAGGAAAACCCAGGACCA

35 Id. de sec. n.º: 43: secuencia de aminoácidos de T2A.co

EGRGSLTCDGVEENPGP

Id. de sec. n.º: 137: Secuencia de nucleótidos de Δ CD19.co

40 ATGCCACCACCTCGCCTGCTGTTCTTTCTGCTGTTTCTGACACCTATGGAGGTGCGACCTGAGGAACCACTGG
 TCGTGAAGGTGCGAGGAAGGCGACAATGCCGTGCTGCAGTGCCTGAAAGGCACTTCTGATGGGCCAACTCAGC
 AGCTGACCTGGTCCAGGGAGTCTCCCTGAAGCCTTTTCTGAAACTGAGCCTGGGACTGCCAGGACTGGGAA
 45 TCCACATGCGCCCTCTGGCTATCTGGCTGTTTCTTCAACGTGAGCCAGCAGATGGGAGGATTCTACCTGTG
 CCAGCCAGGACCACCATCCGAGAAGGCCTGGCAGCCTGGATGGACCGTCAACGTGGAGGGGTCTGGAGAAC
 TGTTTAGGTGGAATGTGAGTGACCTGGGAGGACTGGGATGTGGGCTGAAGAACCGCTCCTCTGAAGGCCCAA
 GTTCACCTCAGGGAAGCTGATGAGCCCAAACTGTACGTGTGGGCCAAAGATCGGCCCGAGATCTGGGAGG
 GAGAACCTCCATGCCTGCCACCTAGAGACAGCCTGAATCAGAGTCTGTCCAGGATCTGACAATGGCCCCCG
 50 GGTCCACTCTGTGGCTGTCTTGTGGAGTCCCACCCGACAGCGTGTCCAGAGGCCCTCTGTCTGGACCCACG
 TGCATCCTAAGGGGCCAAAAGTCTGCTGTCACTGGAAGTGAAGGACGATCGGCCTGCCAGAGACATGTGGG
 TCATGGAGACTGGACTGCTGCTGCCACGAGCAACCGCACAGGATGCTGGAAAATACTATTGCCACCGGGGCA
 ATCTGACAATGTCTTCCATCTGGAGATCACTGCAAGGCCCGTGTGTGGCACTGGCTGCTGCGAACCGGAG
 GATGGAAGGTGAGTGTGACTGACTGGCATATCTGATCTTTTGCCTGTGCTCCCTGGTGGGCATTCTGCATCT
 55 GCAGAGAGCCCTGGTGTGCTGCGGAGAAAGAGAAAGAGAATGACTGACCCAACAAGAAGTTTTGA

Id. de sec. n.º: 138: secuencia de aminoácidos de Δ CD19.co

60 MPPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTS DGPTQQLTWSRESPLKPKLKLKSLGLPGLGIHMR
 PLAIWLFI FIVNSQQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSGELFRWNVSDLGLGCLKNRSSEGPSSPSGK
 LMSPKLYVWAKDRPEIWE GEPPLPPRDSL NQSLSQDLTMAPGSTLWLS CGVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGPKS
 LLSLELKDDRPARDMWV METGLLLPRATAQDAGKY YCHRG NLTMSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWKVSAVTLAY
 LIFCLCSLVGILHLQRALVLRKRKRMTDPTRRF*

Tabla 6: Ejemplos adicionales de variantes de caspasa-9

Variantes de iCasp9	Secuencia de ADN	Secuencia de aminoácidos
---------------------	------------------	--------------------------

<p>Fv-L-Caspasa9 WT-2A</p>	<p>(Fv) Id. de sec. n.º: 44 <TGCTCGAGGGAGTGCAGGTGGAgACtATCT CCCCAGGAGACGGGCGCACCTTCCCCAAGC GCGGCCAGACCTGCGTGGTGCACACTACACCG GGATGCTTGAAGATGAAAAGAAAGTTGATT CCTCCCGGGACAGAAAACAAGCCCTTTAAGTT TATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCGAGG CTGGGAAGAAGGGGTTGCCAGATGAGTGT GGGTCAGAGAGCCAAACTGACTATATCTCCA GATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAG GCATCATCCCACCACATGCCACTCTCGTCTTC GATGTGGAGCTTCTAAAACCTGGA-(enlazador) Id. de sec. n.º: 139 TCTGGCGGTGGATCCGGA- (iCasp9) Id. de sec. n.º: 140 GTCGACGGATTTGGTGTGTCGGTGTCTTTG AGAGTTTGGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACCTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTTCGCTT CTCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGTCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATT TCTCTACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTTCGGTTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGGAGACCTTCG ACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGGCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGGA AAACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A) Id. de sec. n.º: 141 GAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGG GACGTGGAGGAAAATCCCGGGGCC</p>	<p>(Fv) Id. de sec. n.º: 45 MLEGVQVETISPGDGRTPFKRGQTC VVHYTGMLEDGKQVDSSRDRNPKPKF FMLGKQEVIR GWEEGVAQMSVQRAKLTISPDYAY GATGHPGIIPPHATLVFDVELLKE- (enlazador) Id. de sec. n.º: 142 SGGGSG-(iCasp9) Id. de sec. n.º: 143 VDGF GDVGALESRLGNADLAYILSMPCGH CLIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKL RRRFSS LHFMEVKGDLTAKKMLLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQF PGAVYGTGDC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFI QACGGEQKDHGFVASTSPEDESPG SNPEPDA TPFQEGLRTFDQLDAISSLPTSPDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPG CFNFLRKKLFFKTSASRA-Id. de sec. n.º: 144 EGRGSLTTCGDVEENP GP-</p>
<p>Fv-L-iCaspasa9 WT con optimización de codones-T2A con optimización de codones</p>	<p>(Fv)- Id. de sec. n.º: 46 GGAGTGCAGGTGGAGACTATTAGCCCCGGA GATGGCAGAACATTCCCCAAAAGAGGACAG ACTTGCCTCGTGCATTATACTGGAATGCTGG AAGACGGCAAGAAGGTGGACAGCAGCCGG GACCGAAAACAAGCCCTTCAAGTTCATGCTGG GGAAGCAGGAAGTGATCCGGGGCTGGGAG GAAGGAGTCGCACAGATGTCAGTGGGACAG AGGGCCAAACTGACTATTAGCCCAGACTAC GCTTATGGAGCAACCGGCCACCCCGGGATC ATTCCCCTCATGCTACACTGGTCTTCGATGT GGAGCTGCTGAAGCTGGAA-(L)-Id. de sec. n.º: 145 AGCGGAGGAGGATCCGGA- (iCasp9)- Id. de sec. n.º: GTGGACGGGTTTGGAGATGTGGGAGCCCTG GAATCCCTGCGGGGCAATGCCGATCTGGCTT ACATCCTGTCTATGGAGCCTTGGGCGCACTG TCTGATCATTAACAATGTGAACCTTCTGCAGA</p>	<p>(Fv-L)- Id. de sec. n.º: 47 VDGFGDVGALLESRLGNADLAYILSM PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRFRFSS LHFMEVKGDLTAKKMLLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQF PGAVYGTGDC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFI QACGGEQKDHGFVASTSPEDESPG SNPEPDA TPFQEGLRTFDQLDAISSLPTSPDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPG CFNFLRKKLFFKTSASRA- Id. de sec. n.º: 145 EGRGSLTTCGDVEENP GP-(T2A)</p>

	<p>GAGAGCGGGCTGCGGACCAGAACAGGATC CAATATTGACTGTGAAAAGCTGCGGAGAAG GTTCTCTAGTCTGCACTTTATGGTTCGAGGTG AAAGGCGATCTGACCGCTAAGAAAATGGTG CTGGCCCTGCTGGAAGTGGCTCGGCAGGAC CATGGGGCACTGGATTGCTGCGTGGTTCGTG ATCCTGAGTCACGGCTGCCAGGCTTCACATC TGCAGTTCCTGGGGCAGTCTATGGAAGTGA CGGCTGTCCAGTCAGCGTGGAGAAGATCGT GAACATCTTCAACGGCACCTCTTGCCCAAGT CTGGGCGGGAAGCCAAACTGTTCTTTATTC AGGCCTGTGGAGGCGAGCAGAAAGATCAC GGCTTCGAAGTGGCTAGCACCTCCCCGAG GACGAATCACCTGGAAGCAACCCTGAGCCA GATGCAACCCCTTCCAGGAAGGCCTGAGG ACATTTGACCAGCTGGATGCCATCTCAAGCC TGCCACACCTTCTGACATTTTCGTCTCTTAC AGTACTTTCCTGGATTTGTGAGCTGGCGCG ATCCAAAGTCAGGCAGCTGGTACGTGGAGA CACTGGACGATATCTTTGAGCAGTGGGCCCA TTCTGAAGACCTGCAGAGTCTGCTGCTGCGA GTGGCCAATGCTGTCTCTGTGAAGGGATCT ACAACAGATGCCAGGATGCTTCAACTTTCT GAGAAAGAACTGTTCTTTAAGACCTCCGCA TCTAGGGCC-(T2A)- Id. de sec. n.º: CCGCGGGAAGGCCGAGGGAGCCTGCTGAC ATGTGGCGATGTGGAGGAAAACCCAGGACC A</p>	
<p>Fv-iCASP9 S144A-T2A</p>	<p>Id. de sec. n.º: 48 (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGTCTTG AGgctTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTTA CATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGC CTCATTATCAACAATGTGAACCTCTGCCGTG AGTCCGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAA CATCGACTGTGAGAAAGTTGCGGCGTCCCTT TCCTCGCTGCATTTTATGGTGGAGGTGAAGG GCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGTGCTGG CTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACG GTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCACTTCT CTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAG TTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGA TGCCCTGTGTCCGGTTCGAGAAGATTGTGAAC ATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGG GAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTTATCCAGGC CTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTT TGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG TCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCA CCCCCTCCAGGAAGGTTTGGAGACCTTGA CCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGGCCACA CCCAGTGACATCTTTGTGTCTACTCTACTTT CCCAGGTTTTGTTTCTGGAGGGACCCCAAG AGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGAC GACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAG ACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTGCCTAA TGCTGTTTCCGGTAAAAGGATTTATAAACAG ATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGAAAAA AACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAGC C- (T2A)</p>	<p>Id. de sec. n.º: 49 (Fv-L)- VDGFGDVGALeALRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRFRFSSLHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTGDCPVSVEKI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGGE QKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDA TPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI YKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA</p>
<p>Fv-iCASP9 S144D-T2A</p>	<p>Id. de sec. n.º: 50 (Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGTCTTG</p>	<p>Id. de sec. n.º: 51 (Fv-L)- VDGFGDVGALeALRGNADLAYILSME</p>

	<p>AGgactTTGAGGGGAAATGCAGATTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCTCATTATCAACAATGTGAACCTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAAATCATCGACTGTGAGAAGTTGCCGGCTCGCTTCCTCGCTGCATTTTATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGAATGCCCTGTGTCCGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTTTCATCCAGGCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTTTCCCAGGTTTTGTTTCTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGAAAAAACTTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAGC C-(T2A)</p>	<p>PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELARQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGTGDCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHFGEVASTSPEDESPGSNPEPDATPFQEGLRFTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA</p>
<p>Fv-iCASP9 S183A-T2A</p>	<p>Id. de sec. n.º: 52</p> <p>(Fv-L)- GTGCACGGATTGGTGATGTCCGGTCTCTTGAGAGTTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCTCATTATCAACAATGTGAACCTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCgCCAACATCGACTGTGAGAAGTTGCCGGCTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGTGTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGTCCGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTTTCATCCAGGCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTTTCCCAGGTTTTGTTTCTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGAAAAAACTTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAGCC-(T2A)</p>	<p>Id. de sec. n.º: 53</p> <p>(Fv-L)- VDGFGDVGALSLRGNADLAYILSMEPCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELARQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGTGDCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHFGEVASTSPEDESPGSNPEPDATPFQEGLRFTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)</p>
<p>Fv-iCASP9 S196A-T2A</p>	<p>Id. de sec. n.º: 54</p> <p>(Fv-L)- GTGCACGGATTGGTGATGTCCGGTCTCTTGAGAGTTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG</p>	<p>Id. de sec. n.º: 55</p> <p>(Fv-L)- VDGFGDVGALSLRGNADLAYILSMEPCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRRRFSaLHFMVEVKGDLTAKK</p>

	<p>CCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTTCGCTT CTCCgCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAAGGATTTATAAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGGAAA AAACTTTTCTTTAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)</p>	<p>MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTGDCPVSVEKI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGE QKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDA TPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI YKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA -(T2A)</p>
<p>Fv-iCASP9 S196D-T2A</p>	<p>Id. de sec. n.º: 56 (Fv-L)- GTGCACGGATTTGGTGATGTCGGTGTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTTCGCTT CTCCgacCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAAGGATTTATAAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGGAAA AAACTTTTCTTTAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)</p>	<p>Id. de sec. n.º: 57 (Fv-L)- VDGFGDVGALES LRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSdLHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTGDCPVSVEKI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGE QKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDA TPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI YKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA -(T2A)</p>
<p>Fv-iCASP9 C285A-T2A</p>	<p>Id. de sec. n.º: 58 (Fv-L)- GTGCACGGATTTGGTGATGTCGGTGTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA</p>	<p>Id. de sec. n.º: 59 (Fv-L)- VDGFGDVGALES LRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTGDCPVSVEKI</p>

	<p>ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTGCGGTGCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGG CCgcgGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGAAA AAACTTTTCTTTAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)</p>	<p>VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQaGGE QKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDA TPFQEGLRTFDQLDAISSLPTSPDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI YKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA -(T2A)</p>
<p>Fv-iCASP9 A316G-T2A</p>	<p>Id. de sec. n.º: 60</p> <p>(Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTGCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACCTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTGCGGTGCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGgC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGAAA AAACTTTTCTTTAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)</p>	<p>Id. de sec. n.º: 61</p> <p>(Fv-L)- VDGFGDVGALSLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRFRFSSLHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTGCPVSVKEI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGE QKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDg TPFQEGLRTFDQLDAISSLPTSPDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI YKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA -(T2A)</p>
<p>Fv-iCASP9 T317A-T2A</p>	<p>Id. de sec. n.º: 62</p> <p>(Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTGCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACCTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAG</p>	<p>Id. de sec. n.º: 63</p> <p>(Fv-L)- VDGFGDVGALSLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRFRFSS LHFMEVVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQF PGAVYGTGDC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFI</p>

	<p>GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC gCCCCGTTCCAGGAAGTTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGGAAA AACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)</p>	<p>QACGGEQKDHGFVASTSPEDESPG SNPEPDA aPFQEGLRTFDQLDAISSLTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPG CFNFLRKKLFFKTSASRA -(T2A)</p>
<p>Fv-iCASP9 T317C-T2A</p>	<p>Id. de sec. n.º: 64</p> <p>(Fv-L)- GTTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACCTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC tgCCCCGTTCCAGGAAGTTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGGAAA AACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)</p>	<p>Id. de sec. n.º: 65</p> <p>(Fv-L)- VDGFGDVGALSLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRFRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQF PGAVYGTDCG PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFI QACGGEQKDHGFVASTSPEDESPG SNPEPDA cPFQEGLRTFDQLDAISSLTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPG CFNFLRKKLFFKTSASRA -(T2A)</p>
<p>Fv-iCASP9 T317S-T2A</p>	<p>Id. de sec. n.º: 66</p> <p>(Fv-L)- GTTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACCTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC</p>	<p>Id. de sec. n.º: 67</p> <p>(Fv-L)- VDGFGDVGALSLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRFRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQF PGAVYGTDCG PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFI QACGGEQKDHGFVASTSPEDESPG SNPEPDA</p>

	<p>GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTGCGGTGCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC tCCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAGGGATTTATAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGAAA AACTTTTCTTTAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)</p>	<p>sPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPG CFNFLRKKLFFKTSASRA -(T2A)</p>
<p>Fv-iCASP9 F326K-T2A</p>	<p>Id. de sec. n.º: 68 (Fv-L)- GTGCACGGATTTGGTGTGTCGGTGTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACCTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGTCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTGCGGTGCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCaaagG ACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAGGGATTTATAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGAAA AACTTTTCTTTAAACATCAGCTAGCAGAG CC</p>	<p>Id. de sec. n.º: 69 (Fv-L)- VDGFGDVGALSLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRFRFSSLHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTGCPVSVVEKI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGE QKDHGFVASTSPEDESPGSNPEPDA TPFQEGLRTkdQLDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI YKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA</p>
<p>Fv-iCASP9 D327K-T2A</p>	<p>Id. de sec. n.º: 70 (Fv-L)- GTGCACGGATTTGGTGTGTCGGTGTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACCTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGTCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC</p>	<p>Id. de sec. n.º: 71 (Fv-L)- VDGFGDVGALSLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRFRFSSLHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTGCPVSVVEKI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGE QKDHGFVASTSPEDESPGSNPEPDA TPFQEGLRTfkQLDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI</p>

	<p>TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCa AgCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGATTTATAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGAAA AACTTTTCTTTAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)</p>	<p>YKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA- (T2A)</p>
<p>Fv-iCASP9 D327R-T2A</p>	<p>Id. de sec. n.º: 72</p> <p>GTCGACGGATTGTTGGTATGTCGGTGTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACCTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGGCTGCTT CTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGCAGGACCAC GGTGTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCa ggCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGATTTATAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGAAA AACTTTTCTTTAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)</p>	<p>Id. de sec. n.º: 73</p> <p>(Fv-L)- VDGFGDVGALES LRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRFRFSSLHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTGDCPVSVVEKI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGE QKDHGFVASTSPEDESPGSNPEPDA TPFQEGLRTFrQLDAISSLPTPSDIFVS Y STFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDIF EQWAHSEDLQSLLRVANAVSVKGIY KQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA- (T2A)</p>
<p>Fv-iCASP9 D327G-T2A</p>	<p>Id. de sec. n.º: 74</p> <p>GTCGACGGATTGTTGGTATGTCGGTGTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACCTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGGCTGCTT CTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGCAGGACCAC GGTGTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG</p>	<p>Id. de sec. n.º: 75</p> <p>(Fv-L)- VDGFGDVGALES LRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRFRFSSLHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTGDCPVSVVEKI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGE QKDHGFVASTSPEDESPGSNPEPDA TPFQEGLRTFgQLDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAHSEDLQSLLRVANAVSVKGI YKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA- (T2A)</p>

	<p>GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG gCCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGAAA AACTTTTCTTTAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)</p>	
<p>Fv-iCASP9 Q328K-T2A</p>	<p>Id. de sec. n.º: 76</p> <p>(Fv-L)- GTCCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACaAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGAAA AACTTTTCTTTAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)</p>	<p>Id. de sec. n.º: 77</p> <p>VDGFGDVGALES LRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRFRFSSLHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTGDCPVSVVEKI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGE QKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDA TPFQEGLRTFDkLDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI YKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA- (T2A)</p>
<p>Fv-iCASP9 Q328R-T2A</p>	<p>Id. de sec. n.º: 78</p> <p>(Fv-L)- GTCCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT</p>	<p>Id. de sec. n.º: 79</p> <p>(Fv-L)- VDGFGDVGALES LRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRFRFSSLHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTGDCPVSVVEKI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGE QKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDA TPFQEGLRTFDrLDAISSLPTPSDIFVSY STFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDIF EQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIY KQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA- (T2A)</p>

	<p>TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACagGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGAAA AACTTTTCTTTAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)</p>	
<p>Fv-iCASP9 L329K-T2A</p>	<p>Id. de sec. n.º: 80</p> <p>(Fv-L)- GTCCGACGGATTTGGTGTGTCGGTGTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACCTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGTCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTACGGCTGTGACGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTTCGGTTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACCAGaaGGACGCCATATCTAGTTTGCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGAAA AACTTTTCTTTAAACATCAGCTAGCAGAG CC</p>	<p>Id. de sec. n.º: 81</p> <p>(Fv-L)- VDGFGDVGALES LRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRFRFSSLHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTGCPVSVVEKI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGE QKDHGFVASTSPEDESPGSNPEPDA TPFQEGLRTFDQkDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI YKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA</p>
<p>Fv-iCASP9 L329E-T2A</p>	<p>Id. de sec. n.º: 82</p> <p>(Fv-L)- GTCCGACGGATTTGGTGTGTCGGTGTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACCTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGTCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTACGGCTGTGACGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTTCGGTTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC</p>	<p>Id. de sec. n.º: 83</p> <p>(Fv-L)- VDGFGDVGALES LRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRFRFSSLHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTGCPVSVVEKI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGE QKDHGFVASTSPEDESPGSNPEPDA TPFQEGLRTFDQeDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI YKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA- (T2A)</p>

	<p>ACCCCGTTCCAGGAAGTTTTGAGGACCTTCG ACCAGgaGGACGCCATATCTAGTTTGCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTCAAAGGGATTTATAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGAAA AAACCTTTCTTTAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)</p>	
<p>Fv-iCASP9 L329G-T2A</p>	<p>Id. de sec. n.º: 84</p> <p>GTCGACGGATTTGGTATGTCGGTGTCTTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACCTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGGCTCGCTT CTCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAG GCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGTCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGTTTTGAGGACCTTCG ACCAGggcGACGCCATATCTAGTTTGCCACA CCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTTT CCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAAG AGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCTGGAC GACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAG ACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAA TGCTGTTTCGGTCAAAGGGATTTATAACAG ATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGAAAA AACTTTTCTTTAAACATCAGCTAGCAGAGC C</p>	<p>Id. de sec. n.º: 85</p> <p>VDGFGDVGALES LRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVILSH GCQASHLQFP GAVYGT DGCPVSVEKI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGE QKDHGFVASTSPEDESPGSNPEPDA TPFQEGLRTFDQgDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI YKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA</p>
<p>Fv-L-Caspasa9 D330A-T2A</p>	<p>Id. de sec. n.º: 86</p> <p>(Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTATGTCGGTGTCTTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACCTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGGCTCGCTT CTCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAG GCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGTCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGTTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTGcCGCCATATCTAGTTTGCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA</p>	<p>Id. de sec. n.º: 87</p> <p>(Fv-L)- VDGFGDVGALES LRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSS LHFVMEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVILSHGCQASHLQF PGAVYGTDCG PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFI QACGGEQKDHGFVASTSPEDESPG SNPEPDA TPFQEGLRTFDQLaAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPG CFNFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)</p>

	<p>GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGAAA AACTTTTCTTTAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)</p>	
<p>Fv-L-Caspasa9 D330E-T2A</p>	<p>Id. de sec. n.º: 88 (Fv-L)- GTCCGACGGATTTGGTATGTCCGGTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACCTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATT TCTCTACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCCGGTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTGGCGcCGCCATATCTAGTTTGCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGAAA AACTTTTCTTTAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)</p>	<p>Id. de sec. n.º: 89 (Fv-L)- VDGFGDVGALSLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRFFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQF PGAVYGTGDC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFI QACGGEQKDHGFEVASTSPEDES SNPEPDA TPFQEGLRFTDQLeAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKMPG CFNFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)</p>
<p>Fv-L-Caspasa9 D330N-T2A</p>	<p>Id. de sec. n.º: 90 (Fv-L)- GTCCGACGGATTTGGTATGTCCGGTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACCTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATT TCTCTACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCCGGTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTGGCGcCGCCATATCTAGTTTGCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA</p>	<p>Id. de sec. n.º: 91 (Fv-L)- VDGFGDVGALSLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRFFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQF PGAVYGTGDC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFI QACGGEQKDHGFEVASTSPEDES SNPEPDA TPFQEGLRFTDQLnAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKMPG CFNFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)</p>

	GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGGAAA AAACTTTTCTTTAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)	
Fv-L-Caspasa9 D330V-T2A	Id. de sec. n.º: 92 (Fv-L)- GTTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACCTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTGCCTT CTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTGGC Gc CGCCATATCTAGTTTGCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGGAAA AAACTTTTCTTTAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)	Id. de sec. n.º: 93 (Fv-L)- VDGFGDVGALSLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQF PGAVYGTDCG PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFI QACGGEQKDHGFVASTSPEDESPG SNPEPDA TPFQEGLRTFDQLvAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPG CFNFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)
Fv-L-Caspasa9 D330G-T2A	Id. de sec. n.º: 94 (Fv-L)- GTTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACCTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTGCCTT CTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTGGC Gc CGCCATATCTAGTTTGCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACA	Id. de sec. n.º: 95 (Fv-L)- VDGFGDVGALSLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQF PGAVYGTDCG PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFI QACGGEQKDHGFVASTSPEDESPG SNPEPDA TPFQEGLRTFDQLgAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPG CFNFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)

	<p>GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGGAAA AAACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)</p>	
<p>Fv-L-Caspasa9 D330S-T2A</p>	<p>Id. de sec. n.º: 96</p> <p>(Fv-L)- GTTCGACGGATTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTGCCTT CTCCTCGCTGCATTTTATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATT TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTGGCAGCCATATCTAGTTTGCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGGAAA AAACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)</p>	<p>Id. de sec. n.º: 97</p> <p>(Fv-L)- VDGFGDVGALSLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRFFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQF PGAVYGTGDC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFI QACGGEQKDHGFVASTSPEDESPG SNPEPDA TPFQEGLRTFDQLsAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPG CFNFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)</p>
<p>Fv-iCASP9 A331K-T2A</p>	<p>Id. de sec. n.º: 98</p> <p>(Fv-L)- GTTCGACGGATTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTGCCTT CTCCTCGCTGCATTTTATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATT TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTGGACaagATATCTAGTTTGCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGGAAA AAACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAG</p>	<p>Id. de sec. n.º: 99</p> <p>(Fv-L)- VDGFGDVGALSLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRFFSSLHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTGDCPVSVEKI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGE QKDHGFVASTSPEDESPGSNPEPDA TPFQEGLRTFDQLDKISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI YKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA- (T2A)</p>

<p>Fv-L-iCaspasa9 F404Y-T2A</p>	<p>CC-(T2A) Id. de sec. n.º: 100 (Fv-L)- GTTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGTTTGGAGACCTTCG ACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCTGGAGGGACCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAACA GATGCCTGGTTGCTTaTAATTTCTCCGGAAA AACTTTTCTTTAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)</p>	<p>Id. de sec. n.º: 101 (Fv-L)- VDGFGDVGALSLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRFRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMLLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQF PGAVYGTGDC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFI QACGGEQKDHGFVASTSPEDESPG SNPEPDA TPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPG CyNFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)</p>
<p>Fv-L-iCASP9 F404W-T2A</p>	<p>Id. de sec. n.º: 102 (Fv-L)- GTTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGTTTGGAGACCTTCG ACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCTGGAGGGACCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAACA GATGCCTGGTTGCTTggAATTTCTCCGGAAA AACTTTTCTTTAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)</p>	<p>Id. de sec. n.º: 103 (Fv-L)- VDGFGDVGALSLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRFRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMLLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQF PGAVYGTGDC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFI QACGGEQKDHGFVASTSPEDESPG SNPEPDA TPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPG CwNFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)</p>
<p>Fv-L-iCaspasa9</p>	<p>Id. de sec. n.º: 104</p>	<p>Id. de sec. n.º: 105</p>

<p>N405Q-T2A</p>	<p>(Fv-L)- GTGCACGGATTGGTGTATGTCGGTGTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAATTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGGCTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAG GCGCACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGTCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATT TCTCTACGGCTGTGAGCCAGCCACCTGCA GTTCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAGGGATTATAAACA GATGCCTGGTTGCTTTcagTTCCCTCCGAAAA AACTTTTCTTTAAACATCAGCTAGCAGAGC C- (T2A)</p>	<p>(Fv-L)- VDGFGDVGALSLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRFFSS LHFVMEVKGDLTAKKMLLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQF PGAVYGTGDC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFI QACGGEQKDHGFVASTSPEDESPG SNPEPDA TPFQEGLRFTDQLDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPG CFqFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)</p>
<p>Fv-L- iCaspasa9 N405Q con optimización de codones-T2A</p>	<p>Id. de sec. n.º: 106</p> <p>(Fv-L)- GTGGACGGGTTTGGAGATGTGGGAGCCCTG GAATCCCTGCGGGGCAATGCCGATCTGGCTT ACATCCTGTCTATGGAGCCTTGCAGCCACTG TCTGATCATTAAACAATGTGAATTCTGCAGA GAGAGCGGGCTGCGGACCAGAACAGGATC CAATATTGACTGTGAAAAGCTGCGGAGAAG GTTCTCTAGTCTGCACTTTATGGTGCAGGTG AAAGGCGATCTGACCGCTAAGAAAATGGTG CTGGCCCTGCTGGAATGGCTCGGCAGGAC CATGGGGCACTGGATTGCTGCGTGGTTCGTG ATCCTGAGTCAAGGCTGCCAGGCTTACATC TGCAGTTCCCTGGGGCAGTCTATGGAAGTGA CGGCTGTCCAGTCAGCGTGGAGAAGATCGT GAACATCTTCAACGGCACCTCTGCCCAAGT CTGGGCGGGAAGCCCAACTGTTCTTTATTC AGGCCTGTGAGGGCGAGCAGAAAGATCAC GGCTTCGAAGTGGCTAGCACCTCCCCGAG GACGAATCACCTGGAAGCAACCCTGAGCCA GATGCAACCCCTTCCAGGAAGGCCTGAGG ACATTTGACCAGCTGGATGCCATCTCAAGCC TGCCACACCTTCTGACATTTTCGTCTCTTAC AGTACTTTCCCTGGATTTGTGAGCTGGCGCG ATCCAAAGTCAGGCAGCTGGTACGTGGAGA CACTGGACGATATCTTTGAGCAGTGGGCCCA TTCTGAAGACCTGCAGAGTCTGCTGCTGCGA GTGGCCAATGCTGTCTCTGTGAAGGGGATCT ACAAACAGATGCCAGGATGCTTcagTTTCT GAGAAAGAAACTGTTCTTTAAGACCTCCGCA TCTAGGGCC-(T2A)</p>	<p>Id. de sec. n.º: 107</p> <p>(Fv-L)- VDGFGDVGALSLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRFFSS LHFVMEVKGDLTAKKMLLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQF PGAVYGTGDC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFI QACGGEQKDHGFVASTSPEDESPG SNPEPDA TPFQEGLRFTDQLDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPG CFqFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)</p>
<p>Fv-iCA5P9 F406L-T2A</p>	<p>Id. de sec. n.º: 108</p> <p>(Fv-L)-</p>	<p>Id. de sec. n.º: 109</p> <p>(Fv-L)-</p>

	<p>GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACCTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTGCCTT CTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATT TCTCTACGGCTGTGAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATcTCCTCCGAAA AACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)</p>	<p>VDGFGDVGALES LRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRFRFSSLHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTGDCPVSVEKI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGE QKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDA TPFQEGLRFTDQLDAISSLPSPDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI YKQMPGCFNLLRKKLFFKTSASRA- (T2A)</p>
<p>Fv-iCASP9 F406T-T2A</p>	<p>Id. de sec. n.º: 110</p> <p>(Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACCTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTGCCTT CTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATT TCTCTACGGCTGTGAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATcCCTCCGAAA AACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAG C- (T2A)</p>	<p>Id. de sec. n.º: 111</p> <p>(Fv-L)- VDGFGDVGALES LRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRFRFSSLHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTGDCPVSVEKI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGE QKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDA TPFQEGLRFTDQLDAISSLPSPDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI YKQMPGCFNLLRKKLFFKTSASRA- (T2A)</p>
<p>Fv-L-iCaspasa9 S144A N405Q-T2A con optimización de codones</p>	<p>Id. de sec. n.º: 112</p> <p>(Fv-L)- GTGGACGGGTTTGGAGATGTGGGAGCCCTG GAAGcCCTGCGGGGCAATGCCGATCTGGCTT</p>	<p>Id. de sec. n.º: 113</p> <p>(Fv-L)- VDGFGDVGALEaLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI</p>

	<p>ACATCCTGTCTATGGAGCCTTGCGGCCACTG TCTGATCATTAAACAATGTGAACTTCTGCAGA GAGAGCGGGCTGCGGACCAGAACAGGATC CAATATTGACTGTGAAAAGCTGCGGAGAAG GTTCTCTAGTCTGCACTTTATGGTGCAGGTG AAAGGCGATCTGACCGCTAAGAAAATGGTG CTGGCCCTGCTGGAAGTGGCTCGGCAGGAC CATGGGGCACTGGATTGCTGCGTGGTCTGTG ATCCTGAGTCAAGGCTGCCAGGCTTACATC TGCAGTCCCTGGGGCAGTCTATGGAAGTGA CGGCTGTCCAGTCAGCGTGGAGAAGATCGT GAACATCTTCAACGGCACCTCTTGCCCAAGT CTGGGCGGGAAGCCCAACTGTTCTTTTATTC AGGCCTGTGGAGGCGAGCAGAAAAGATCAC GGCTTCGAAGTGGCTAGCACCTCCCCGAG GACGAATCACCTGGAAGCAACCCTGAGCCA GATGCAACCCCTTCCAGGAAGGCCTGAGG ACATTTGACCAGCTGGATGCCATCTCAAGCC TGCCACACCTTCTGACATTTTCGCTCTTAC AGTACTTTCCCTGGATTTGTGAGCTGGCGCG ATCCAAAGTCAGGCAGCTGGTACGTGGAGA CACTGGACGATATCTTTGAGCAGTGGGCCA TTCTGAAGACCTGCAGAGTCTGCTGCTGCGA GTGGCCAATGCTGTCTCTGTGAAGGGGATCT ACAAACAGATGCCAGGATGCTTCagTTTCT GAGAAAGAAACTGTTCTTTAAGACCTCCGCA TCTAGGGCC-(T2A)</p>	<p>DCEKLRFRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQF PGAVYGTGDC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFI QACGGEQKDHGFVASTSPEDESFG SNPEPDA TPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPG CFqFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)</p>
<p>Fv-iCASP9 S144A D330A-T2A</p>	<p>Id. de sec. n.º: 114</p> <p>(Fv-L)- GTGCACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGgcTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTTA CATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGC CTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGTG AGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAA CATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCTGCTTC TCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAGG GCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGG CTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACG GTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCAATCT CTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAG TTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGA TGCCCTGTGTGCGGTCGAGAAGATTGTGAAC ATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGG GAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGGC CTGTGGTGGGGAGCAGAAAAGACCATGGGTT TGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG TCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCA CCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGA CCAGCTGGcCGCCATATCTAGTTTGCCACACA CCCAGTGACATCTTTGTGTCTACTCTACTTT CCCAGGTTTTGTTTCTGGAGGGACCCCAAG AGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGAC GACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAG ACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTGCCTAA TGCTGTTTCCGGTGAAGGGATTTATAAACAG ATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGGAAAA AACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAGC C- (T2A)</p>	<p>Id. de sec. n.º: 115</p> <p>(Fv-L)- VDGFGDVGALeLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRFRFSSLHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTGDCPVSVEKI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIACGGE QKDHGFVASTSPEDESFGSNPEPDA TPFQEGLRTFDQLaAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI YKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA</p>
<p>Fv-iCASP9 S144D D330A-T2A</p>	<p>Id. de sec. n.º: 116</p> <p>(Fv-L)- GTGCACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTG AGgcTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTTA CATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGC CTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGTG</p>	<p>Id. de sec. n.º: 117</p> <p>(Fv-L)- VDGFGDVGALeLRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRFRFSSLHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH</p>

	<p>AGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAA CATCGACTGTGAGAAGTTGCGGGCTCGCTTC TCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAGG GCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGG CTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACG GTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCT CTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAG TTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGA TGCCCTGTGTGGTTCGAGAAGATTGTGAAC ATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGG GAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGGC CTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTT TGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAG TCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCA CCCCCTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGA CCAGCTGGcCGCCATATCTAGTTTGCCCACA CCCAGTGACATCTTTGTGTCTACTCTACTTT CCCAGGTTTTGTTTCTGGAGGGACCCCAAG AGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGAC GACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAG ACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAA TGCTGTTTCGGTGAAGGGATTTATAAACAG ATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGAAAA AACTTTTCTTTAAACATCAGCTAGCAGAGC C- (T2A)</p>	<p>GCQASHLQFPGAVYGTGDCPVSVEKI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGE QKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDA TPFQEGLRFTDQLaAIISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI YKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA</p>
<p>Fv-iCASP9 S196A D330A-T2A</p>	<p>Id. de sec. n.º: 118</p> <p>(Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACCTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGGCTCGCTT CTCCgCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAG GCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTGGTTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTGGcCGCCATATCTAGTTTGCCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAGGGATTTATAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGAAA AACTTTTCTTTAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)</p>	<p>Id. de sec. n.º: 119</p> <p>(Fv-L)- VDGFGDVGALESIRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVMFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSaLHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTGDCPVSVEKI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGE QKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDA TPFQEGLRFTDQLaAIISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI YKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA- (T2A)</p>
<p>Fv-iCASP9 S196D D330A-T2A</p>	<p>Id. de sec. n.º: 120</p> <p>(Fv-L)- GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACCTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGGCTCGCTT</p>	<p>Id. de sec. n.º: 121</p> <p>(Fv-L)- VDGFGDVGALESIRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVMFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRRRFSdLHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTGDCPVSVEKI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGE</p>

	<p>CTCCgacCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTGGcCGCCATATCTAGTTTGCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTATAAACA GATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGGAAA AAACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAG CC-(T2A)</p>	<p>QKDHGFVASTSPEDESPGSNPEPDA TPFQEGLRTFDQLaAIISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI YKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA- (T2A)</p>
<p>Fv-L-iCaspasa9 T317S N405Q-T2A con optimización de codones</p>	<p>Id. de sec. n.º: 122 (Fv-L)- GTGGACGGGTTTGGAGATGTGGGAGCCCTG GAATCCCTGCGGGGCAATGCCGATCTGGCTT ACATCCTGTCTATGGAGCCTTGGCGCCACTG TCTGATCATTAACAATGTGAACCTTCTGCAGA GAGAGCGGGCTGCGGACCAGAACAGGATC CAATATTGACTGTGAAAAGCTGCGGAGAAG GTTCTCTAGTCTGCACTTTATGGTCGAGGTG AAAGGCGATCTGACCGCTAAGAAAATGGTG CTGGCCCTGCTGGAAGTGGCTCGGCAGGAC CATGGGGCACTGGATTGCTGCGTGGTCTGCTG ATCCTGAGTCACGGCTGCCAGGCTTCACATC TGCAGTCCCTGGGGCAGTCTATGGAAGTGA CGGCTGTCCAGTCAGCGTGGAGAAGATCGT GAACATCTTCAACGGCACCTCTTGCCCAAGT CTGGGCGGGAAGCCCAAACTGTTCTTTATTC AGGCCTGTGGAGGCGAGCAGAAAGATCAC GGCTTCGAAGTGGCTAGCACCTCCCCCGAG GACGAATCACCTGGAAGCAACCCTGAGCCA GATGCAAgCCCCTTCCAGGAAGGCCTGAGG ACATTTGACCAGCTGGATGCCATCTCAAGCC TGCCACACCTTCTGACATTTTCGTCTCTTAC AGTACTTTCCCTGGATTTGTGAGCTGGCGCG ATCCAAAGTCAGGCAGCTGGTACGTGGAGA CACTGGACGATATCTTTGAGCAGTGGGCCCA TTCTGAAGACCTGCAGAGTCTGCTGCTGCGA GTGGCCAATGCTGTCTCTGTGAAGGGGATCT ACAAACAGATGCCAGGATGCTTcagTTTCT GAGAAAGAACTGTTCTTTAAGACCTCCGCA TCTAGGGCC-(T2A)</p>	<p>Id. de sec. n.º: 123 (Fv-L)- VDGFGDVGALES LRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRFRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQF PGAVYGTDCG PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGKPKLFFI QACGGEQKDHGFVASTSPEDESPG SNPEPDA sPFQEGLRTFDQLDAIISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPG CFqFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)</p>
<p>Fv-L-Caspasa9 D330A N405Q-T2A</p>	<p>Id. de sec. n.º: 124 (Fv-L)- GTGCACGGATTTGGTGTGTCGGTGTCTTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACCTTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGGCTGCTT CTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG</p>	<p>Id. de sec. n.º: 125 (Fv-L)- VDGFGDVGALES LRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRFRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQF PGAVYGTDCG PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGKPKLFFI QACGGEQKDHGFVASTSPEDESPG</p>

	<p>GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCG ACCAGCTGGcCGCCATATCTAGTTTGCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCTACTCTACTT TCCAGGTTTTGTTTCTGGAGGGACCCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAACA GATGCCTGGTTGCTTcagTTTTCTCCGAAAA AACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAGC C- (T2A)</p>	<p>SNPEPDA TPFQEGLRTFDQLaAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPG CFqFLRKKLFFKTSASRA-(T2A)</p>
<p>Fv-iCASP9 ATPF316AVPI-T2A</p>	<p>Id. de sec. n.º: 126 (Fv-L)- GTGCACGGATTTGGTGATGTGCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACCTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC gtgCCcaTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGA CCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCACA CCCAGTGACATCTTTGTGTCTACTCTACTTT CCCAGGTTTTGTTTCTGGAGGGACCCCAA AGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGAC GACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAG ACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAA TGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAG ATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGAAAA AACTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAGC C- (T2A)</p>	<p>Id. de sec. n.º: 127 (Fv-L)- VDGFGDVGALES LRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRFRFSSLHFMVEVKGDLTAKK MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSH GCQASHLQFPGAVYGTGDCPVSVKEI VNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIACGGGE QKDHGFVASTSPEDESPGSNPEPDA vPiQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVS YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGI YKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRA- (T2A)</p>
<p>Fv-iCASP9 isaqt-T2A</p>	<p>Id. de sec. n.º: 128 (Fv-L)- GTGCACGGATTTGGTGATGTGCGGTGCTCTTG AGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTT ACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTG CCTCATTATCAACAATGTGAACCTCTGCCGT GAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCA ACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTTCGCTT CTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAG GGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG GCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCAC GGTGTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTC</p>	<p>Id. de sec. n.º: 129 (Fv-L)- VDGFGDVGALES LRGNADLAYILSME PCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNI DCEKLRFRFSS LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAR QDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQF PGAVYGTGDC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFI QACGGEQKDHGFVASTSPEDESPG SNPEPDA TPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVS</p>

<p>TCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCA GTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG ATGCCCTGTGTCGGTTCGAGAAGATTGTGAA CATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTG GGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGG CCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGT TTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGA GTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCC ACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGGAGACCTTCG ACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGGCCAC ACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTT TCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCAA GAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGA CGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAA GACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGTA ATGCTGTTTCGGTCAAAGGGATTTATAACA GATGCCgatatccgcacagacaCTCCGAAAAAA CTTTTCTTTAAAACATCAGCTAGCAGAGCC- (T2A)</p>	<p>YSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDI FEQWAH SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPis aqtLRKKLFFKTSASRA-(T2A)</p>
---	---

Id. de sec. n.º: 130, ΔCasp9 (res. 135-416) secuencia de nucleótidos de F406W

5 GGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGAGTTTGGAGGAAATGCAGATTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGC
CCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAATTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTC
CAACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCT
GACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGTGTCTGGACTGCTGCGT
GGTGGTCATTCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCACAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG
10 ATGCCCTGTGTCGGTTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCAGCCTGGGAGGGAAAGCC
CAAGCTCTTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTGGAGTGGCCTCCACTTCCCCT
GAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGGAGACCTTCGAC
CAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGGCCACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTTTCCAGGTTTTGT
TTCCTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCA
15 CTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTCAAAGGGATTTATAAACAGATG
CCTGGTTGCTTTAAT**TGG**CTCCGAAAAAACTTTTCTTTAACTCCGAAAAAACTTTTCTTTAAAACATCA

Id. de sec. n.º: 131, ΔCasp9 (res. 135—416) secuencia de aminoácidos F406W

20 GFGDVGALLESRLGNADLAYILSMPCGHCLIIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKK
MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGTGDCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACG
GEQKDHGFEVASTPEDESPGSNPEPDATPFQEGLRTRFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYV
ETLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFN**W**LRKKLFFNSGKNFSLKH

Id. de sec. n.º: 132, ΔCasp9 (res. 135—416) secuencia de nucleótidos F406Y

25 GGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGAGTTTGGAGGAAATGCAGATTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGC
CCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAATTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTC
CAACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCT
GACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGTGTCTGGACTGCTGCGT
30 GGTGGTCATTCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCACAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG
ATGCCCTGTGTCGGTTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCAGCCTGGGAGGGAAAGCC
CAAGCTCTTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTGGAGTGGCCTCCACTTCCCCT
GAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGGAGACCTTCGAC
CAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGGCCACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTTTCCAGGTTTTGT
35 TTCCTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCA
CTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTCAAAGGGATTTATAAACAGATG
CCTGGTTGCTTTAAT**TAC**CTCCGAAAAAACTTTTCTTTAACTCCGAAAAAACTTTTCTTTAAAACATCA

Id. de sec. n.º: 133, ΔCasp9 (res. 135—416) secuencia de aminoácidos F406Y

40 GFGDVGALLESRLGNADLAYILSMPCGHCLIIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKK
MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGTGDCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACG
GEQKDHGFEVASTPEDESPGSNPEPDATPFQEGLRTRFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYV
ETLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFN**Y**LRKKLFFNSGKNFSLKH

Id. de sec. n.º: 134, ΔCasp9 (res. 135-416) secuencia de nucleótidos de C403A

5 GGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGC
 CCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAACCTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTC
 CAACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCT
 GACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACTGCTGCGT
 10 GGTGGTCATTCTCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG
 ATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGAAGCC
 CAAGCTCTTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCT
 GAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGAC
 CAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGGCCACACCCAGTGACATCTTTGTCTCTACTCTACTTTCCAGGTTTTGT
 15 TTCCTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCA
 CTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAGATG
 CCTGGCGCCTTTAATTTCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAACTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAACATCA

15 Id. de sec. n.º: 135, ΔCasp9 (res. 135—416) secuencia de aminoácidos C403A

15 GFGDVGALESRLGNADLAYILSMPECGHCLINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKK
 MVLALLELARQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGTGDCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACG
 GEQKDHGFEVASTPEDESPGSNPEPDATPFQEGLRFTDQLDAISSLPSPDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYV
 20 ETLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGAFNFLRKKLFFNSGKNFSLKH

25 El término “un” o “uno/a” se puede referir a uno o a una pluralidad de los elementos que modifica (p. ej., “un reactivo”
 puede significar uno o más reactivos) salvo que quede claro en el contexto que se describe uno cualquiera de los
 elementos o más de uno de los elementos. Como se utiliza en la presente memoria, el término “aproximadamente” se
 refiere a un valor comprendido en 10 % del parámetro subyacente (es decir, más o menos 10 %), y el uso del término
 “aproximadamente” al principio de una cadena de valores modifica 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 entre 90 gramos y 110 gramos. Además, cuando se
 describe en la presente memoria un listado de valores (p. ej., aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 % o 86 %) el
 listado incluye todos los valores intermedios y fraccionados de los mismos (p. ej., 54 %, 85,4 %).

30 Algunas realizaciones de la tecnología se definen en la una o varias reivindicaciones que se indican a continuación.

REIVINDICACIONES

1. Un ligando multimérico para usar en un método para el tratamiento del cáncer; comprendiendo dicho método controlar la supervivencia de las células terapéuticas en un sujeto, en donde el método **se caracteriza por**
- 5 a) trasplantar células terapéuticas que comprenden ácido nucleico que codifica un polipéptido quimérico que comprende una región de multimerización y un polipéptido de caspasa-9 que comprende la secuencia de aminoácidos de Id. de sec. n.º: 9 o un polipéptido de caspasa-9 modificado al sujeto, en donde el polipéptido de caspasa-9 modificado comprende
- 10 (i) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la Id. de sec. n.º: 9, y
- 15 (ii) al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en S144A, S144D, Y153A, Y153F, S183A, S195A, S196A, S196D, S307A, D315A, A316G, T317A, T317C, T317E, T317S, P318A, F319A, F319W, F326K, D327G, D327K, D327R, Q328K, Q328R, L329E, L329G, L329K, D330A, D330E, D330G, D330N, D330S, D330V, A331K, C403A, C403S, C403T, F404T, F404W, F404Y, N405A, N405F, N405Q, N405T, F406A, F406T, F406W y F406Y;
- 20 b) administrar posteriormente dicho ligando multimérico a dicho sujeto en una cantidad eficaz para destruir menos del 50 % de células terapéuticas trasplantadas que expresan el polipéptido de caspasa-9, en donde un nivel terapéuticamente eficaz de células terapéuticas sigue activo en el sujeto después de administrar el ligando multimérico; o administrar posteriormente dicho ligando multimérico a dicho sujeto en una cantidad eficaz para destruir menos del 50 % de células terapéuticas trasplantadas que expresan el polipéptido de caspasa-9 modificado, en donde un nivel terapéuticamente eficaz de células terapéuticas sigue activo en el sujeto después de administrar el ligando multimérico; y en donde dicho ligando multimérico se une a la región de multimerización; y dicho polipéptido de caspasa-9 modificado tiene una curva de respuesta a la dosis alargada en respuesta al ligando multimérico en comparación con un polipéptido de caspasa-9 que no está modificado.
- 25
- 30 2. Un ligando multimérico para usar en un método para el tratamiento de la enfermedad del injerto contra el hospedador; comprendiendo dicho método controlar la supervivencia de las células terapéuticas en un sujeto, en donde el método **se caracteriza por**
- 35 a) trasplantar células terapéuticas que comprenden ácido nucleico que codifica un polipéptido quimérico que comprende una región de multimerización y un polipéptido de caspasa-9 que comprende la secuencia de aminoácidos de Id. de sec. n.º: 9 o un polipéptido de caspasa-9 modificado al sujeto, en donde el polipéptido de caspasa-9 modificado comprende
- 40 (i) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la Id. de sec. n.º: 9, y
- 45 (ii) al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en S144A, S144D, Y153A, Y153F, S183A, S195A, S196A, S196D, S307A, D315A, A316G, T317A, T317C, T317E, T317S, P318A, F319A, F319W, F326K, D327G, D327K, D327R, Q328K, Q328R, L329E, L329G, L329K, D330A, D330E, D330G, D330N, D330S, D330V, A331K, C403A, C403S, C403T, F404T, F404W, F404Y, N405A, N405F, N405Q, N405T, F406A, F406T, F406W y F406Y;
- 50 b) administrar posteriormente dicho ligando multimérico a dicho sujeto en una cantidad eficaz para destruir menos del 50 % de células terapéuticas trasplantadas que expresan el polipéptido de caspasa-9, en donde un nivel terapéuticamente eficaz de células terapéuticas sigue activo en el sujeto después de administrar el ligando multimérico; o administrar posteriormente dicho ligando multimérico a dicho sujeto en una cantidad eficaz para destruir menos del 50 % de células terapéuticas trasplantadas que expresan el polipéptido de caspasa-9 modificado, en donde un nivel terapéuticamente eficaz de células terapéuticas sigue activo en el sujeto después de administrar el ligando multimérico; y en donde dicho ligando multimérico se une a la región de multimerización; y dicho polipéptido de caspasa-9 modificado tiene una curva de respuesta a la dosis alargada en respuesta al ligando multimérico en comparación con un polipéptido de caspasa-9 que no está modificado.
- 55
- 60 3. El ligando multimérico para el uso de la reivindicación 1 o 2, en donde menos del 40 % de las células terapéuticas trasplantadas que expresan el polipéptido de caspasa-9 o menos del 40 % de las células terapéuticas trasplantadas que expresan el polipéptido de caspasa-9 modificado se eliminan después del uso del ligando multimérico.
- 65 4. El ligando multimérico para el uso de la reivindicación 1, 2 o 3, en donde las células terapéuticas expresan además un receptor de antígeno quimérico.

5. El ligando multimérico para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la al menos una sustitución de aminoácidos es D330A, D330E o N405Q.
- 5 6. El ligando multimérico para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde se va a utilizar una dosis adicional del ligando multimérico, por el cual al menos un 10 % de las células terapéuticas trasplantadas que expresan el polipéptido de caspasa-9 o el polipéptido de caspasa-9 modificado se van a destruir en comparación con el número de células trasplantadas antes de la dosis adicional.
- 10 7. Un ligando multimérico para usar en un método para el tratamiento del cáncer; comprendiendo dicho método controlar la supervivencia de las células terapéuticas trasplantadas en un sujeto, en donde el método **se caracteriza por**
- 15 a) trasplantar un primer conjunto de células terapéuticas al sujeto, en donde el primer conjunto de células terapéuticas comprende (i) un polinucleótido que codifica un polipéptido quimérico que comprende una región de multimerización y un primer polipéptido de caspasa-9 que comprende la secuencia de aminoácidos de la Id. de sec. n.º: 9 o un primer polipéptido de caspasa-9 modificado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la Id. de sec. n.º: 9, y (ii) un receptor de antígeno quimérico;
- 20 b) trasplantar un segundo conjunto de células terapéuticas al sujeto, en donde el segundo conjunto de células terapéuticas comprende (i) un polinucleótido que codifica un polipéptido quimérico que comprende una región de multimerización y un segundo polipéptido de caspasa-9 modificado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la Id. de sec. n.º: 9, y (ii) un receptor de antígeno quimérico; en donde el primer polipéptido de caspasa-9, o el primer polipéptido de caspasa-9 modificado, y el segundo polipéptido de caspasa-9 modificado, comprenden diferentes secuencias de aminoácidos y tienen diferentes actividades basales, diferentes CI_{50} y/o diferentes curvas de respuesta a la dosis alargadas; y el primer y segundo polipéptidos de caspasa-9 modificados comprenden, cada uno de ellos, una sustitución de aminoácido diferente seleccionada del grupo que consiste en S144A, S144D, Y153A, Y153F, S183A, S195A, S196A, S196D, S307A, D315A, A316G, T317A, T317C, T317E, T317S, P318A, F319A, F319W, F326K, D327G, D327K, D327R, Q328K, Q328R, L329E, L329G, L329K, D330A, D330E, D330G, D330N, D330S, D330V, A331K, C403A, C403S, C403T, F404T, F404W, F404Y, N405A, N405F, N405Q, N405T, F406A, F406T, F406W y F406Y; y
- 25 c) administrar dicho ligando multimérico al sujeto en una cantidad eficaz para destruir más del primer conjunto de células terapéuticas que del segundo conjunto de células terapéuticas, en donde un nivel terapéuticamente eficaz de células terapéuticas del segundo conjunto sigue activo en el sujeto después administrar el ligando multimérico, y en donde dicho ligando multimérico se une a dicha región de multimerización.
- 30 8. Un ligando multimérico para usar en un método para el tratamiento de la enfermedad del injerto contra el hospedador; comprendiendo dicho método controlar la supervivencia de las células terapéuticas en un sujeto, en donde el método **se caracteriza por**
- 35 a) trasplantar un primer conjunto de células terapéuticas al sujeto, en donde el primer conjunto de células terapéuticas comprende (i) un polinucleótido que codifica un polipéptido quimérico que comprende una región de multimerización y un primer polipéptido de caspasa-9 que comprende la secuencia de aminoácidos de la Id. de sec. n.º: 9 o un primer polipéptido de caspasa-9 modificado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la Id. de sec. n.º: 9, y (ii) un receptor de antígeno quimérico;
- 40 b) trasplantar un segundo conjunto de células terapéuticas al sujeto, en donde el segundo conjunto de células terapéuticas comprende (i) un polinucleótido que codifica un polipéptido quimérico que comprende una región de multimerización y un segundo polipéptido de caspasa-9 modificado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la Id. de sec. n.º: 9, y (ii) un receptor de antígeno quimérico; en donde el primer polipéptido de caspasa-9, o el primer polipéptido de caspasa-9 modificado, y el segundo polipéptido de caspasa-9 modificado, comprenden diferentes secuencias de aminoácidos y tienen diferentes actividades basales, diferentes CI_{50} y/o diferentes curvas de respuesta a la dosis alargadas; y el primer y segundo polipéptidos de caspasa-9 modificados comprenden, cada uno de ellos, una sustitución de aminoácido diferente seleccionada del grupo que consiste en S144A, S144D, Y153A, Y153F, S183A, S195A, S196A, S196D, S307A, D315A, A316G, T317A, T317C, T317E, T317S, P318A, F319A, F319W, F326K, D327G, D327K, D327R, Q328K, Q328R, L329E, L329G, L329K, D330A, D330E, D330G, D330N, D330S, D330V, A331K, C403A, C403S, C403T, F404T, F404W, F404Y, N405A, N405F, N405Q, N405T, F406A, F406T, F406W y F406Y; y
- 45 c) administrar dicho ligando multimérico al sujeto en una cantidad eficaz para destruir más del primer conjunto de células terapéuticas que del segundo conjunto de células terapéuticas, en donde un nivel terapéuticamente eficaz de células terapéuticas del segundo conjunto sigue activo en el sujeto
- 50
- 55
- 60
- 65

después administrar el ligando multimérico, y en donde dicho ligando multimérico se une a dicha región de multimerización.

- 5 9. El ligando multimérico para el uso de la reivindicación 7 u 8, en donde se utiliza una dosis adicional del ligando multimérico, por el cual al menos un 10 % de las células terapéuticas trasplantadas que expresan el primer o el segundo polipéptido de caspasa-9 se destruyen en comparación con el número de células trasplantadas antes de la dosis adicional.
- 10 10. El ligando multimérico para el uso de la reivindicación 7, 8 o 9, en donde la al menos una sustitución de aminoácidos es D330A, D330E o N405Q.
- 15 11. El ligando multimérico para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde las células terapéuticas se seleccionan del grupo que consiste en hemocitoblastos, citoblastos mesenquimales (MSC), células plasmáticas (B), miocitos, linfocitos citolíticos naturales (NK), macrófagos, linfocitos infiltrados tumorales (TIL) y linfocitos T.
- 20 12. El ligando multimérico para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la región de multimerización es una región variante FKBP12 que se une a AP1903 o AP20187.
- 25 13. El ligando multimérico para el uso de la reivindicación 12, en donde la región variante FKBP12 es una región FKBP12v36.
- 30 14. El ligando multimérico para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde el ligando es AP1903 o AP20187.
- 35 15. El ligando multimérico para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde se van a usar múltiples dosis de ligando multimérico, con un aumento de los niveles de dosificación entre las múltiples dosis y el aumento de los niveles de dosificación aumenta el número de células terapéuticas que se destruyen.
16. El ligando multimérico para el uso de la reivindicación 15, en donde la dosis se aumenta desde 0,01 mg/kg hasta 1 mg/kg.
17. El ligando multimérico para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 16, en donde el receptor de antígeno quimérico es un receptor de linfocitos T quimérico.
18. El ligando multimérico para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en donde el sujeto es un ser humano.

Abreviatura de construcciones de iCasp9		Media GFP (SD)	% Anexo+ dentro de GFP+ (SD)
F'F-C-Casp9		551 (55,8)	13,5 (3,3)
F'F-C-Casp9 _{C→S}		1268,5 (59,1)	2,6 (0,6)
F'F-Casp9		719 (60,2)	27,3 (4,5)
F-C-Casp9		788,5 (57,8)	26,5 (5,6)
F-Casp9		854 (61,1)	40,2 (9,4)

FIG. 1A

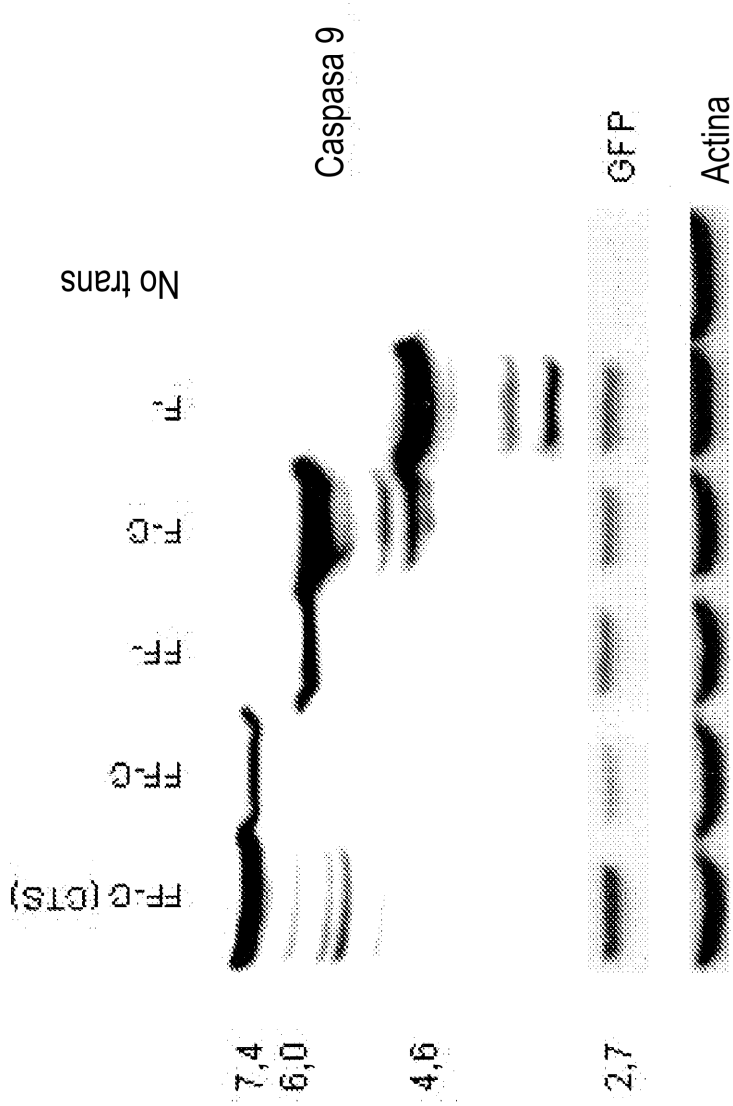
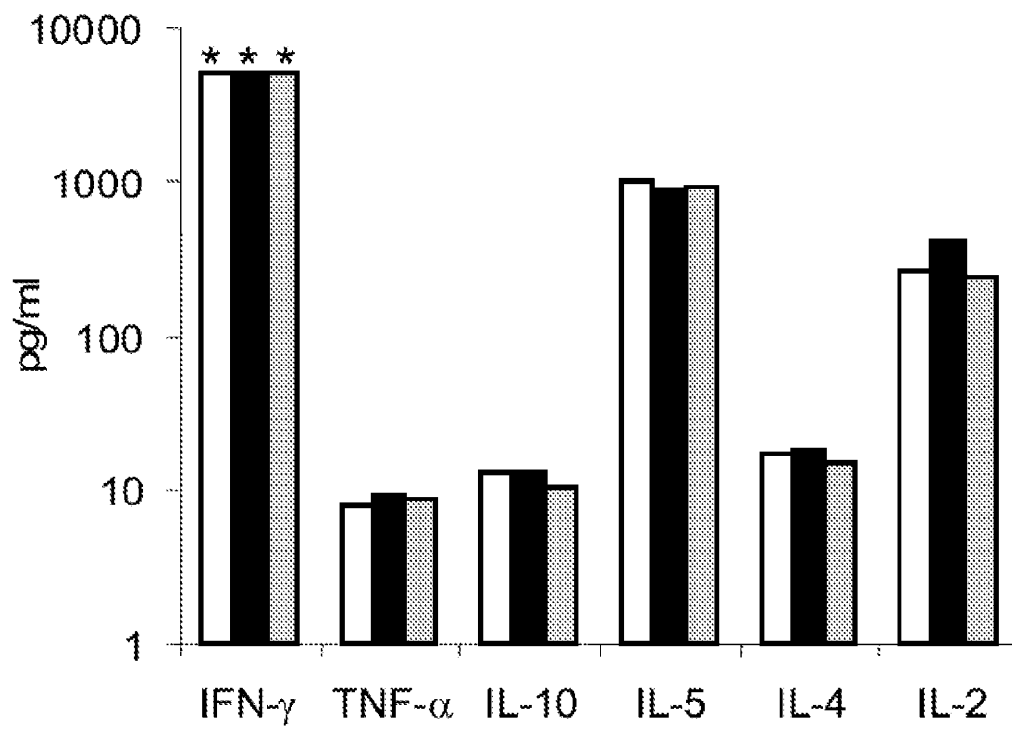
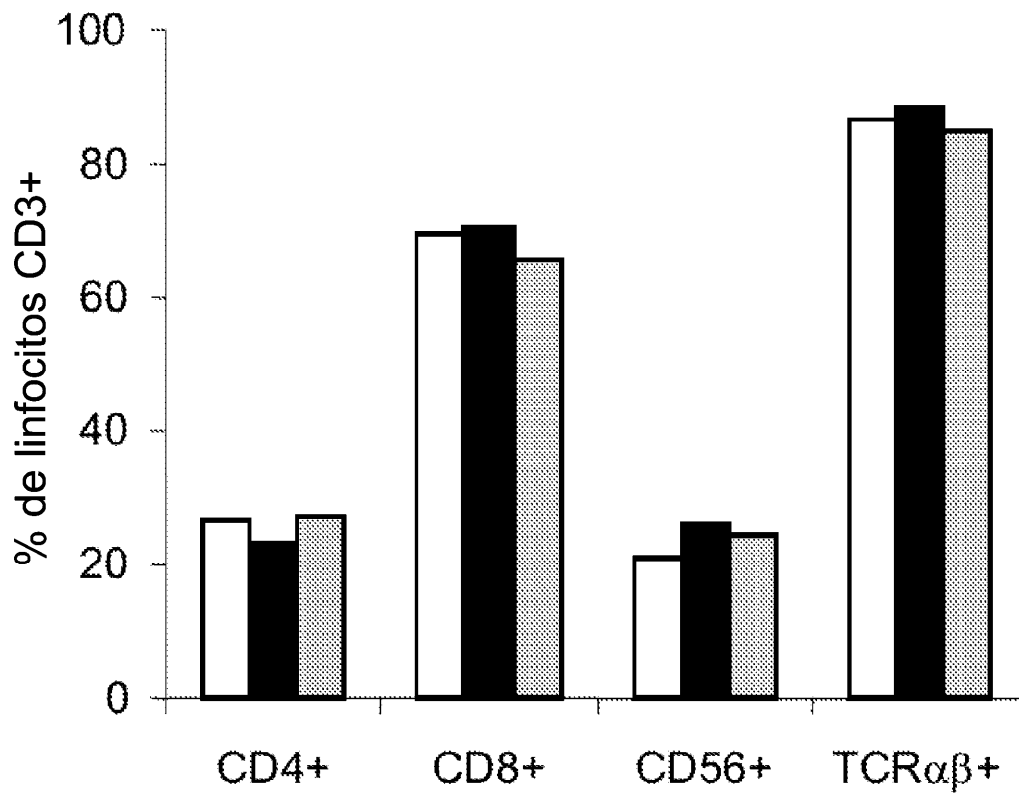


FIG. 1B



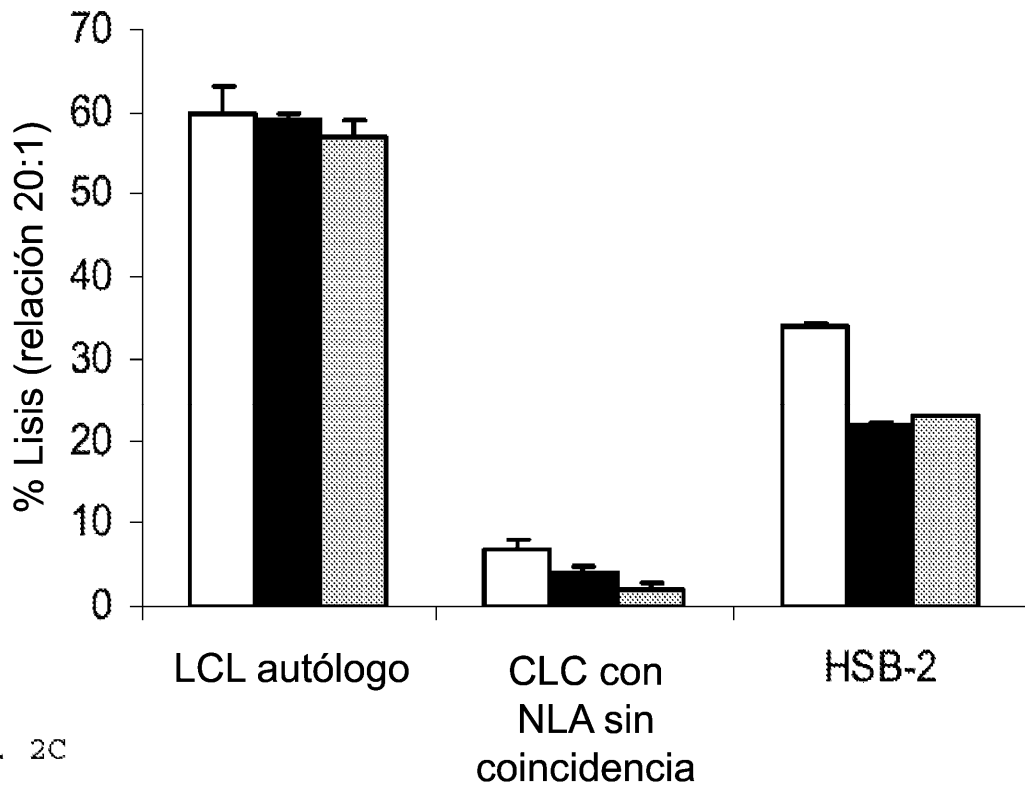


FIG. 2C

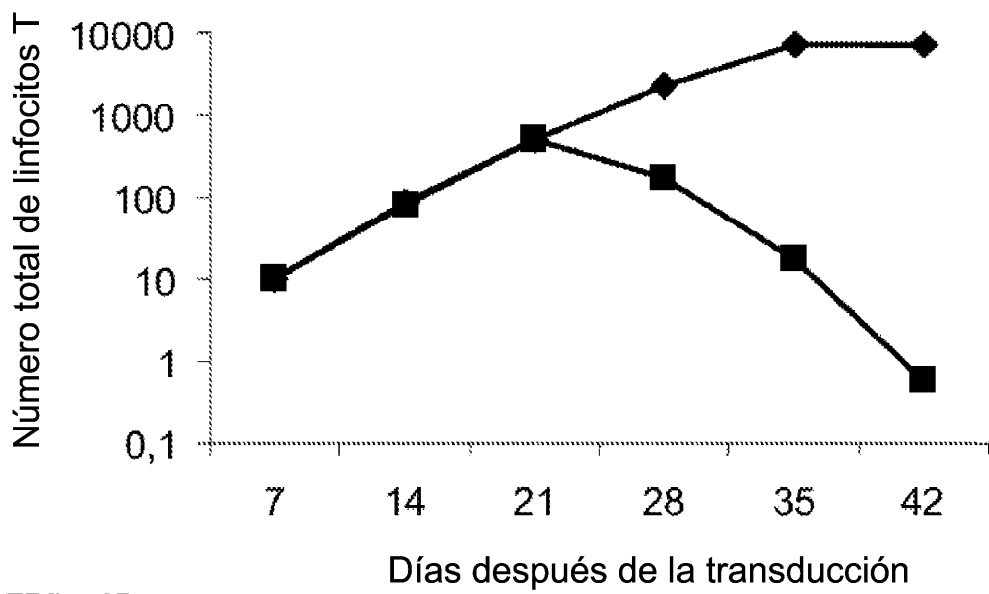


FIG. 2D

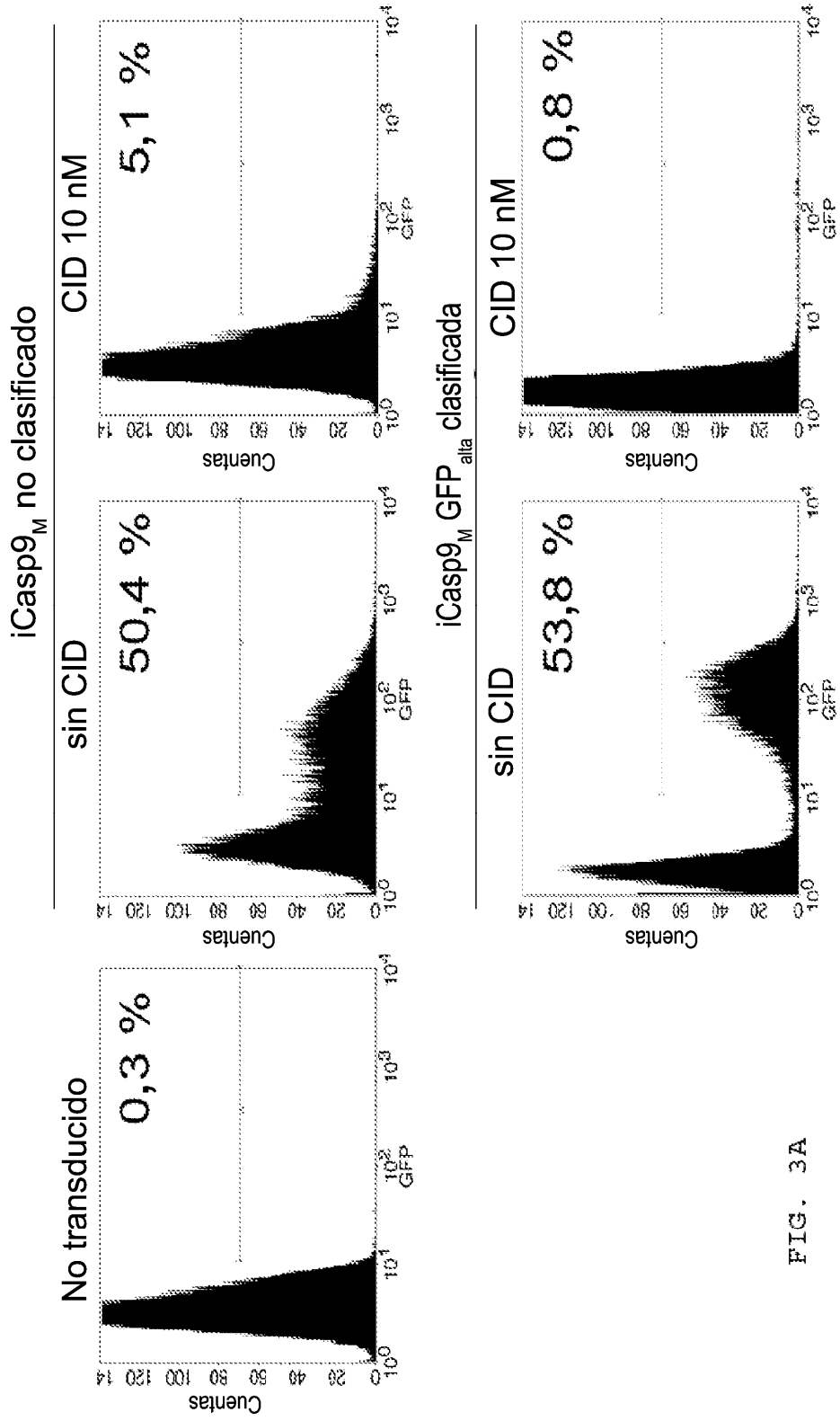
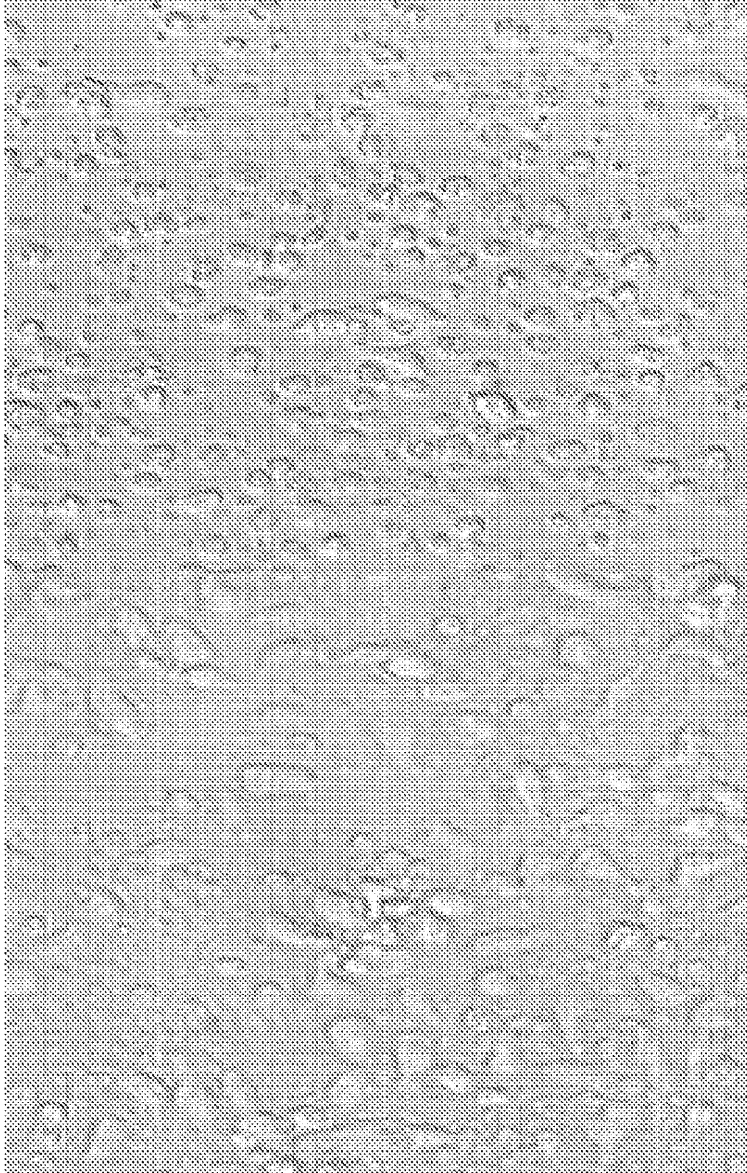


FIG. 3A



No tratado **CID 10 nM**

FIG. 3B

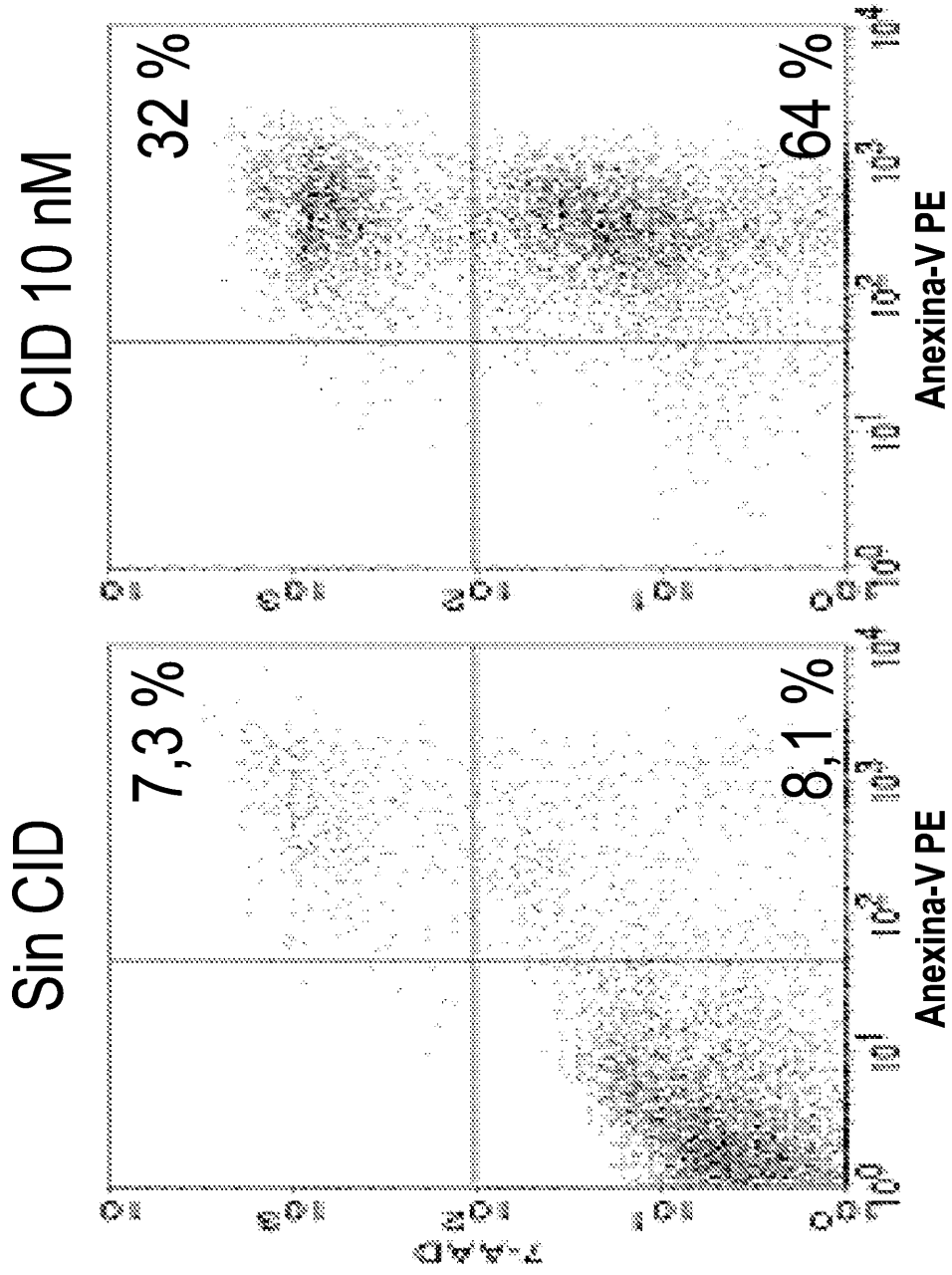


FIG. 3C

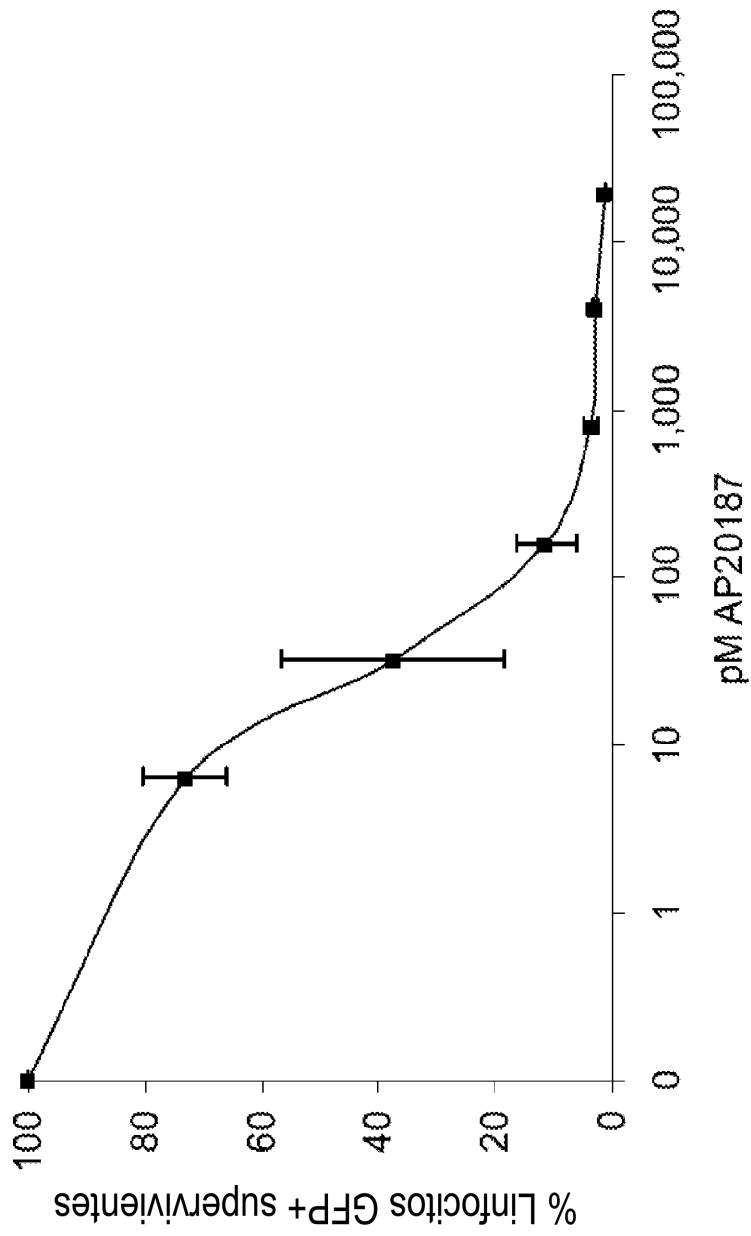
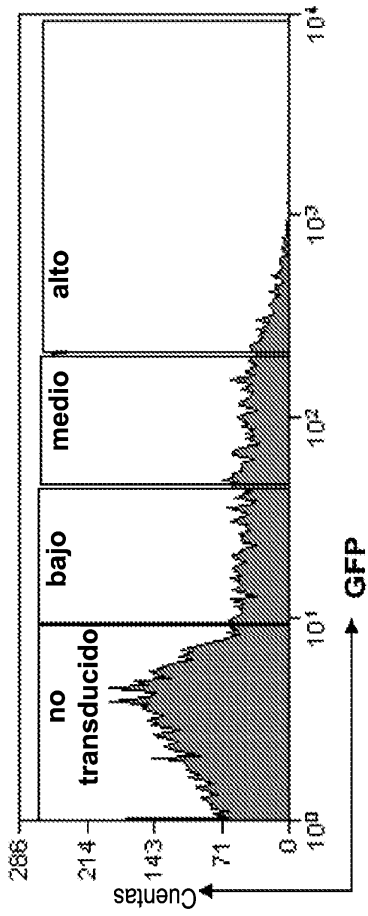
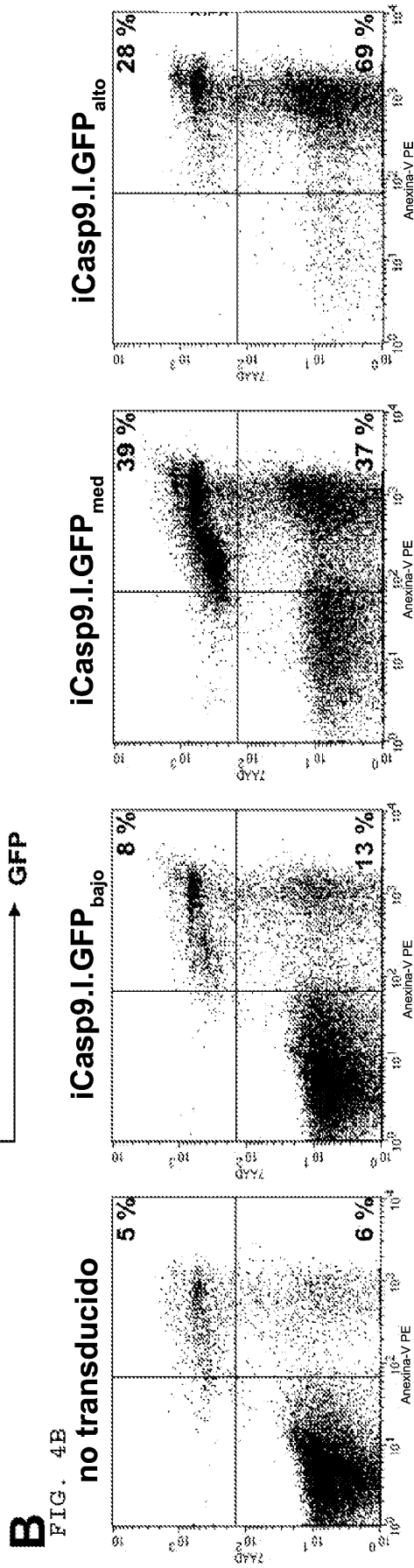


FIG. 3D



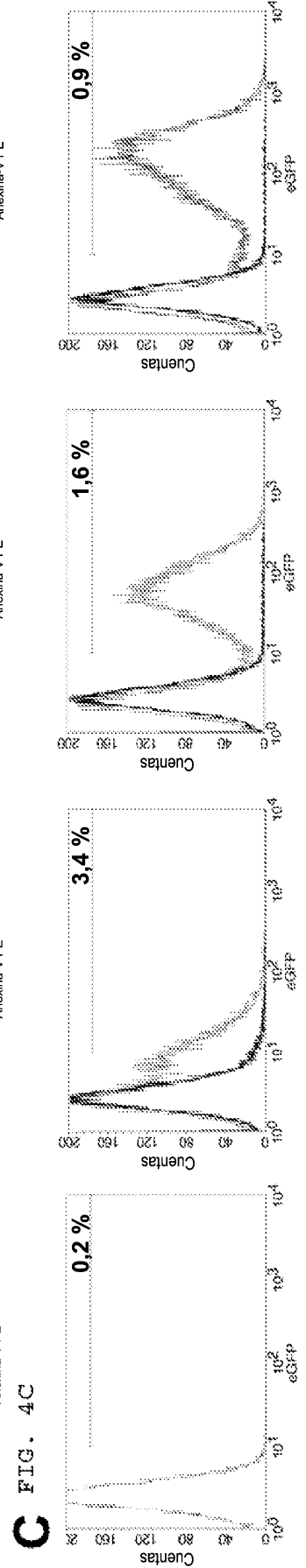
A

FIG. 4A



B

FIG. 4B



C

FIG. 4C

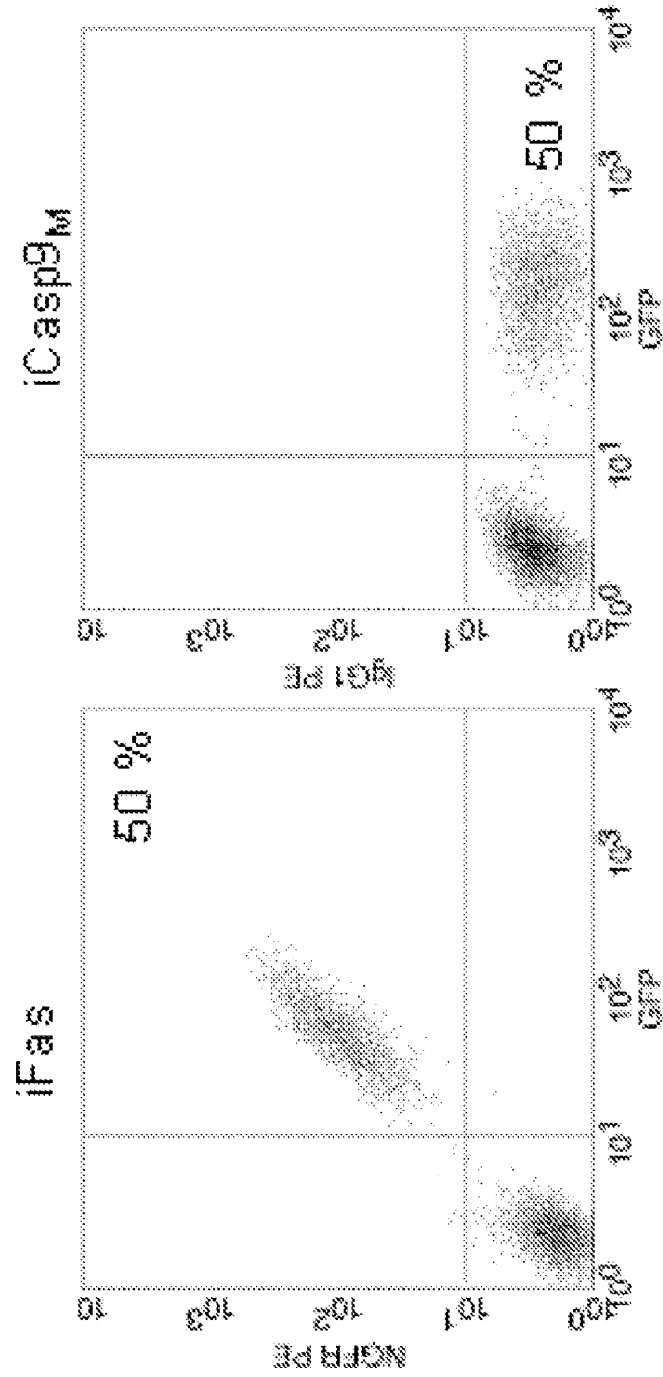


FIG. 5A

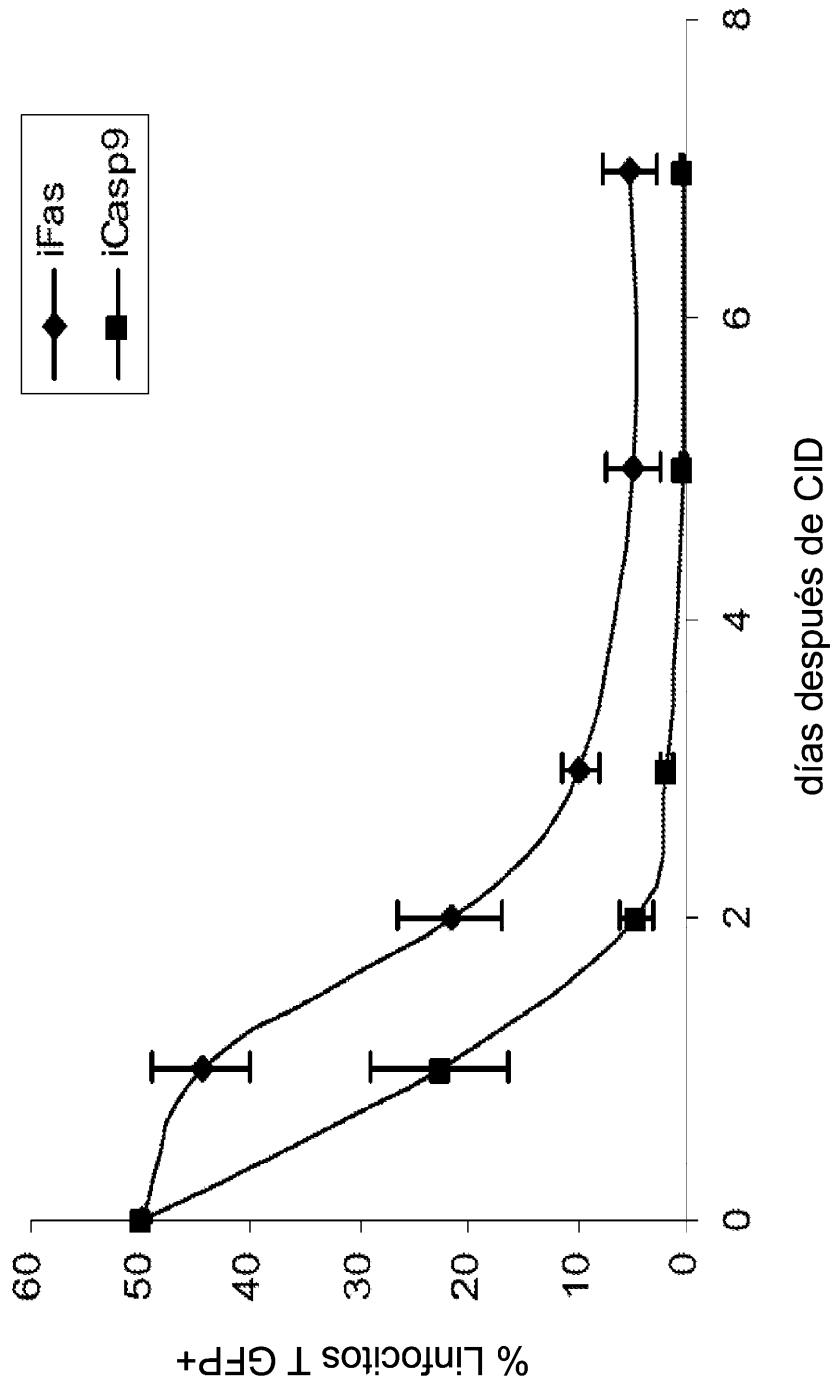


FIG. 5B

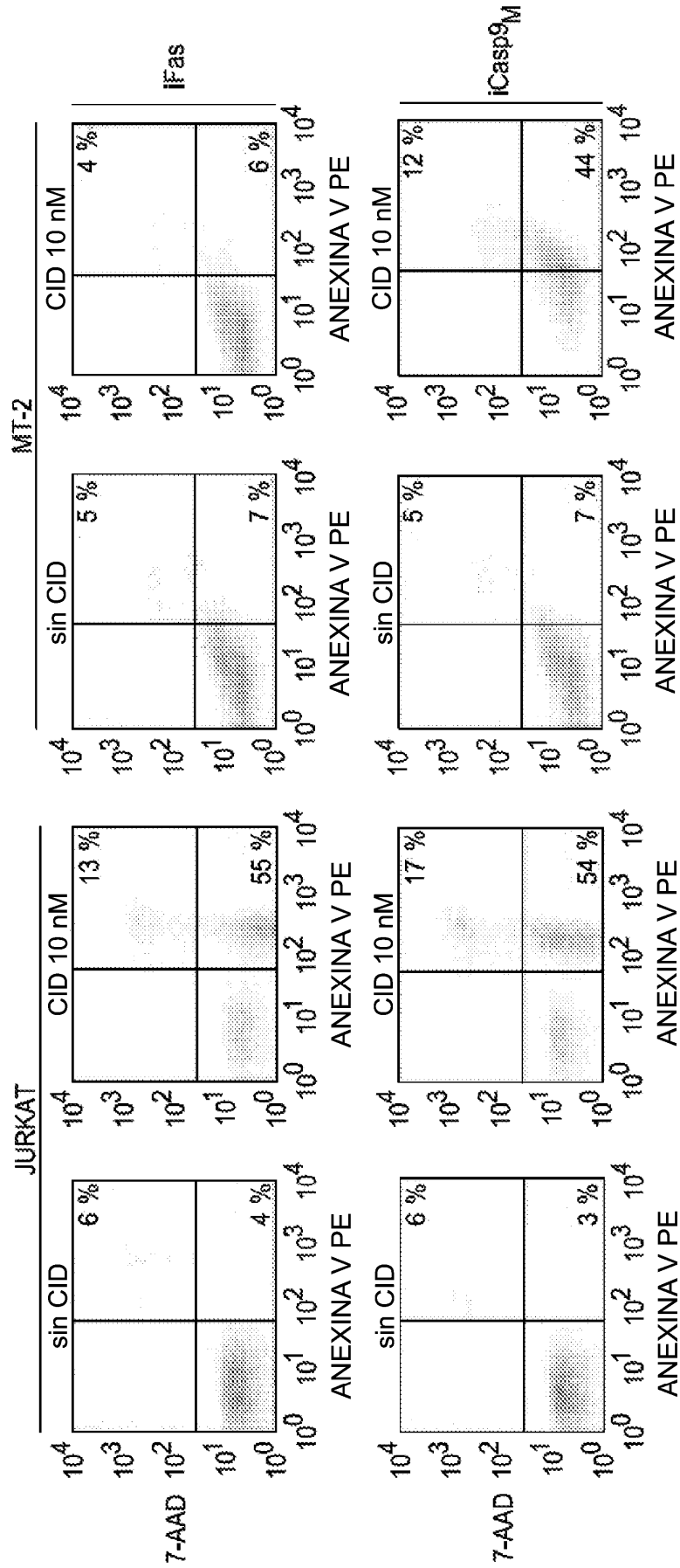


FIG. 5C

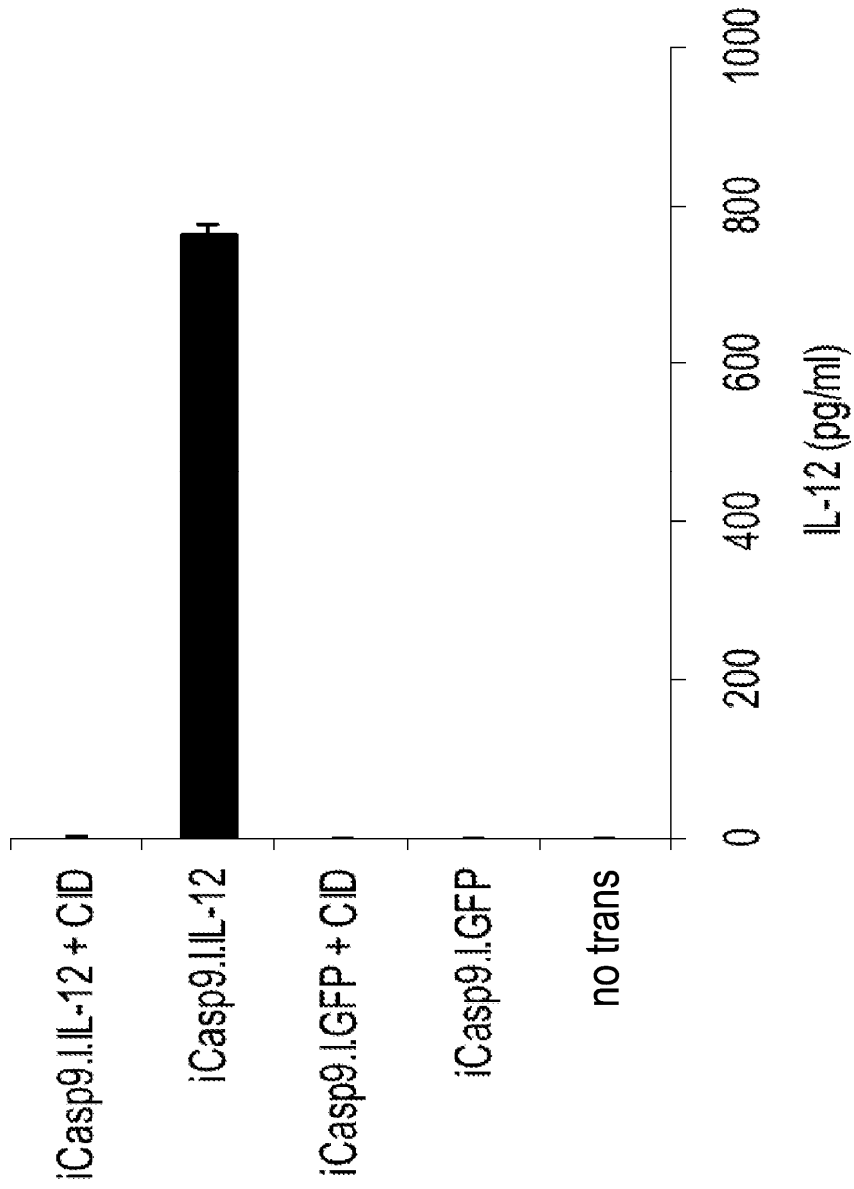


FIG. 6

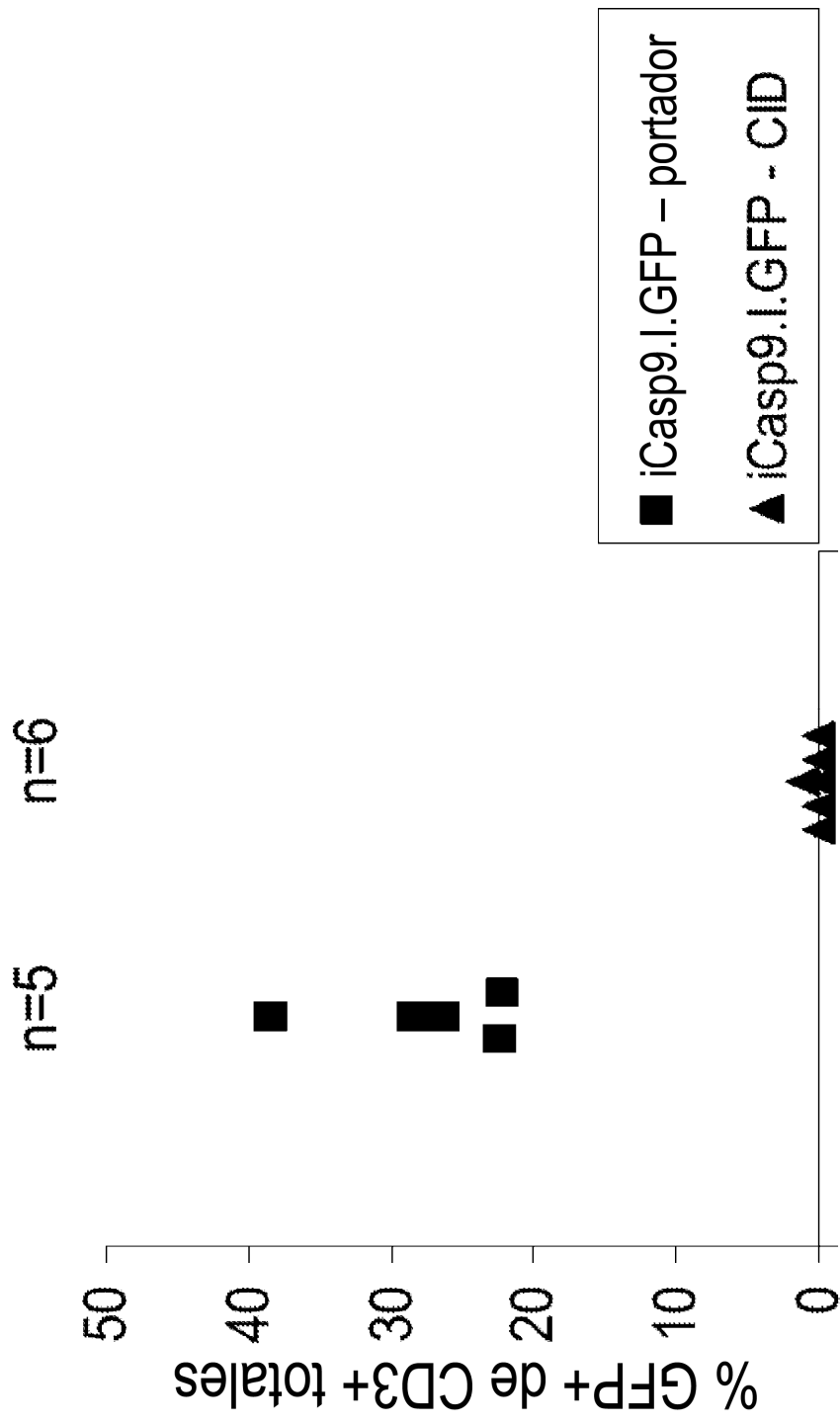


FIG. 7

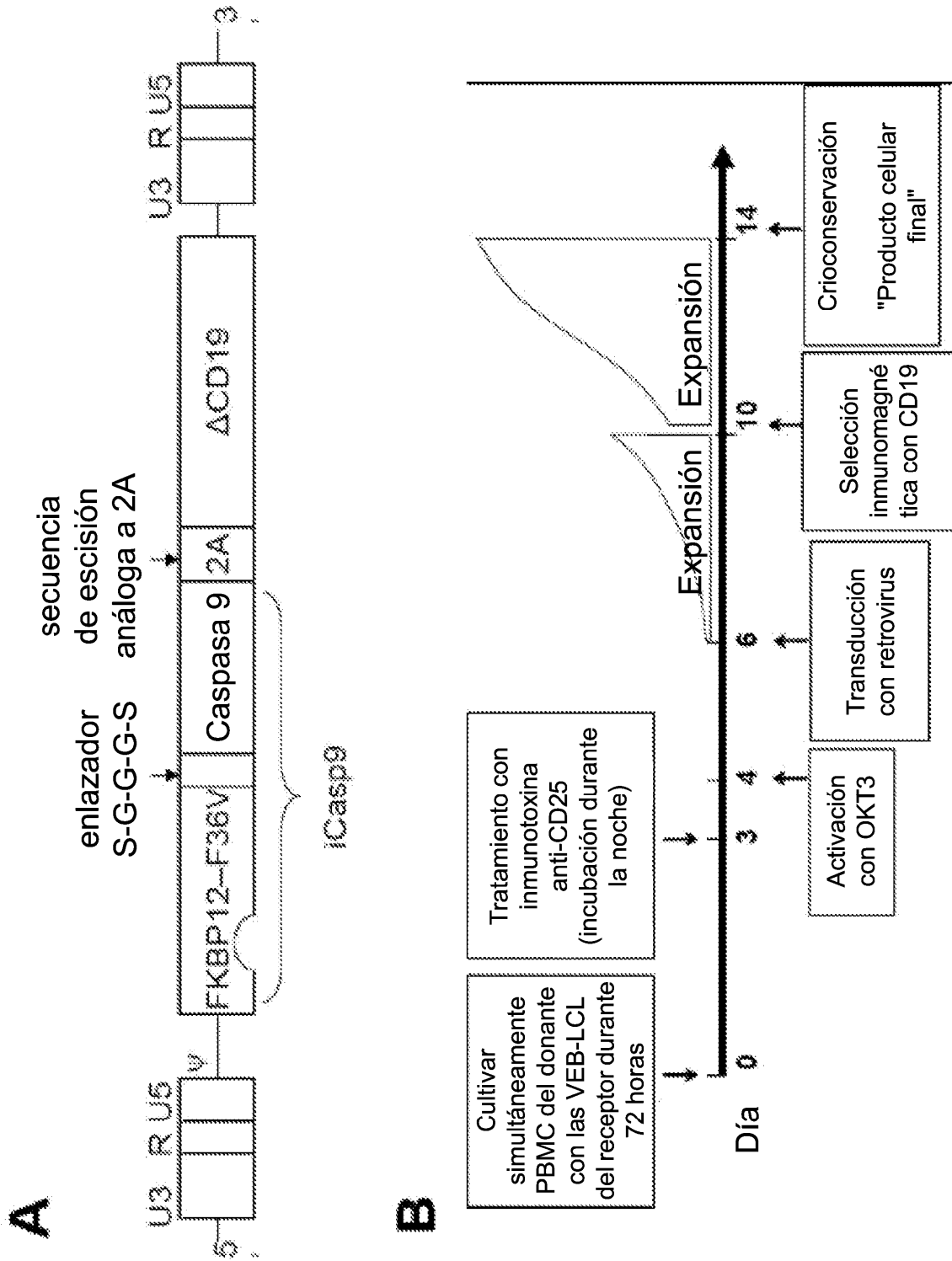


FIG. 8A Y 8B

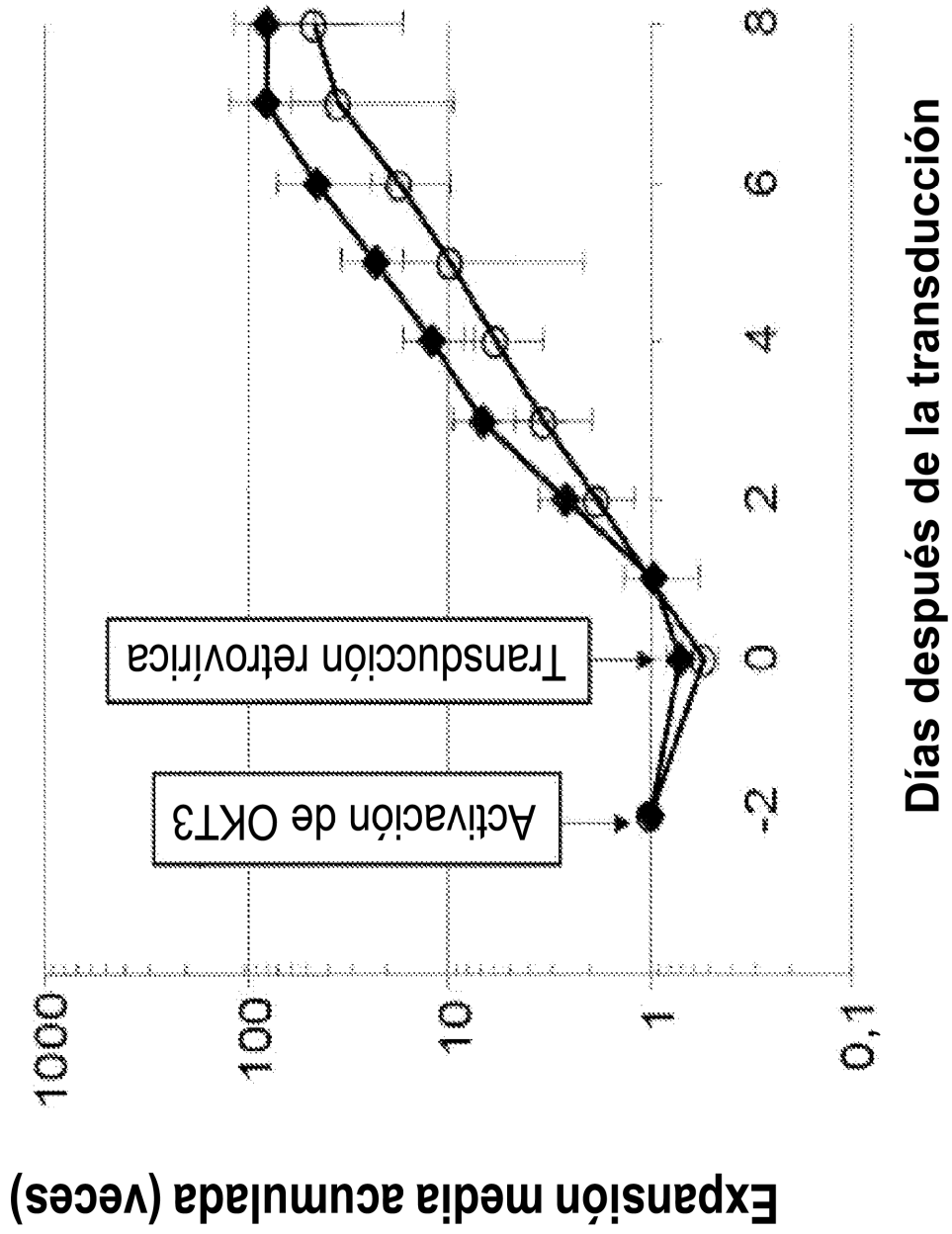


FIG. 9

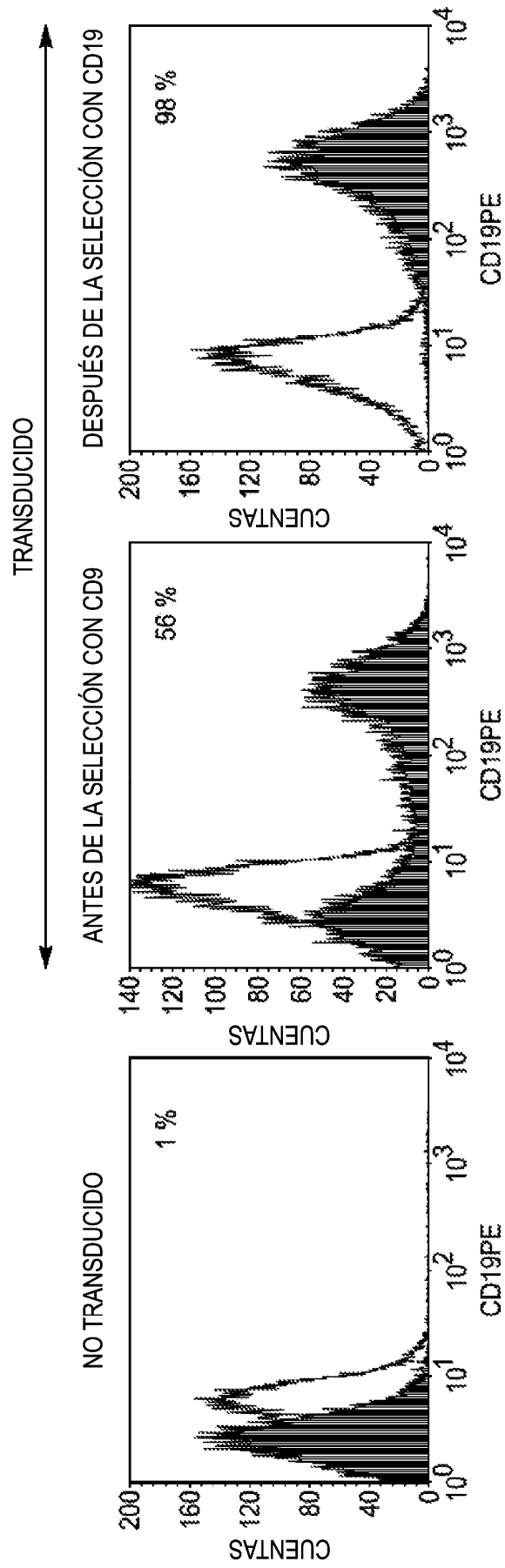
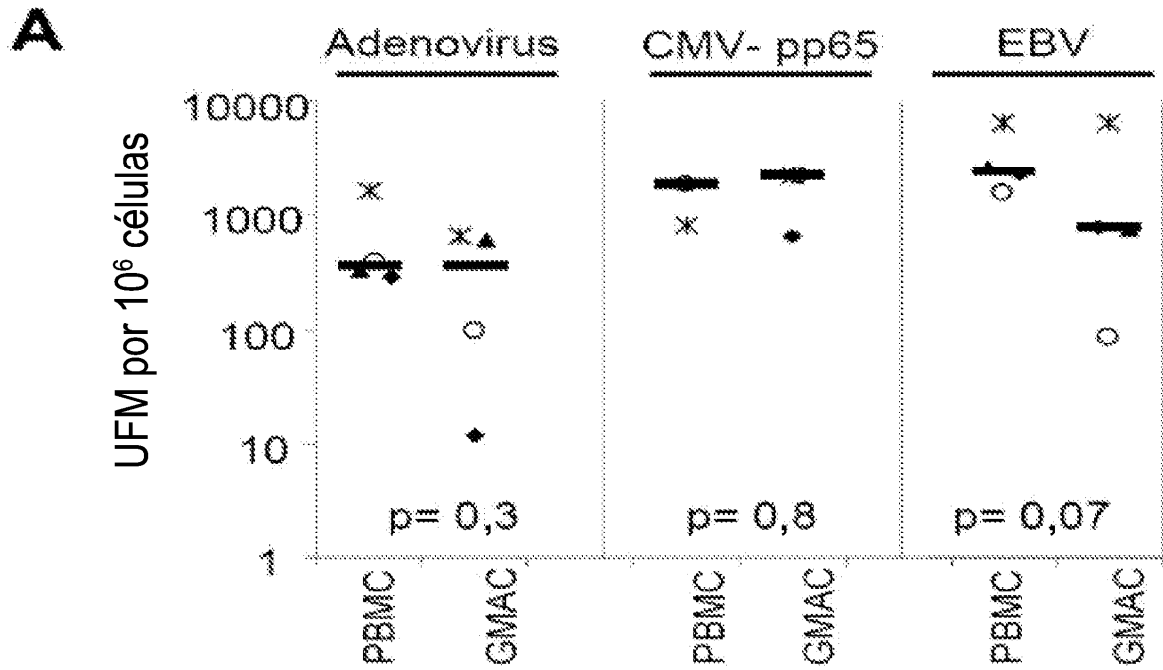


FIG. 10



B

- ◆ VEB-LCL de donante
- ◇ VEB-LCL de donante + 30x K562 frío
- ▲ Blastos de OKT3 de donante

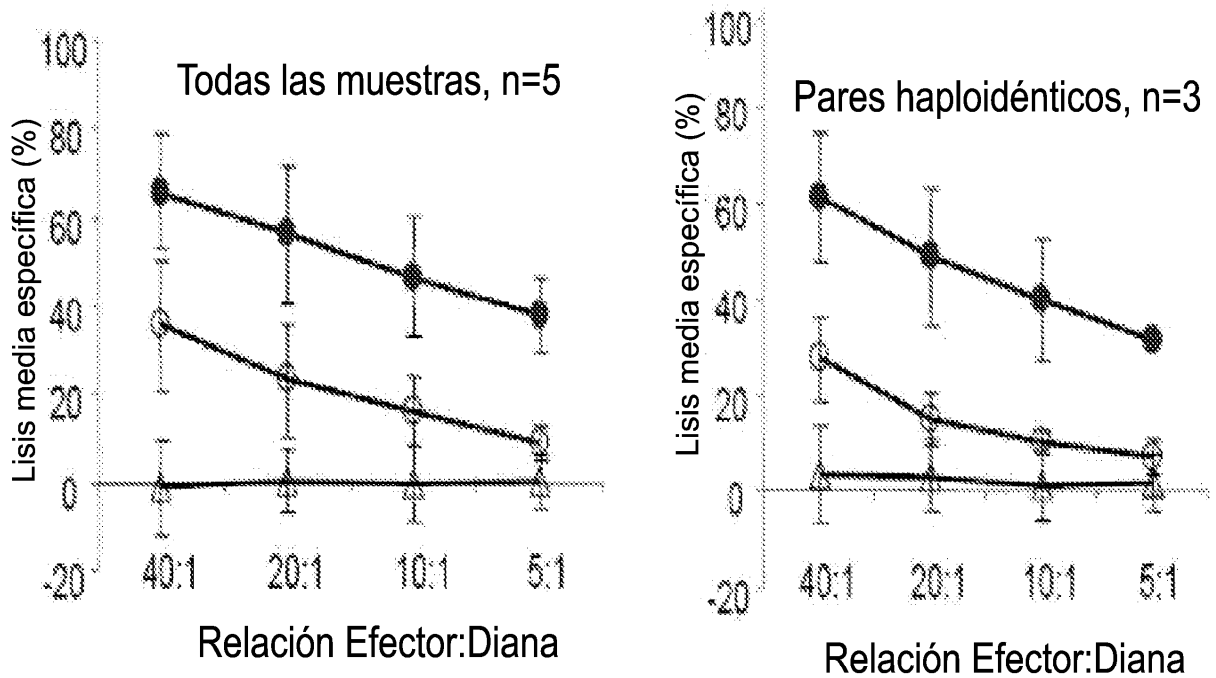


FIG. 11A y 11B

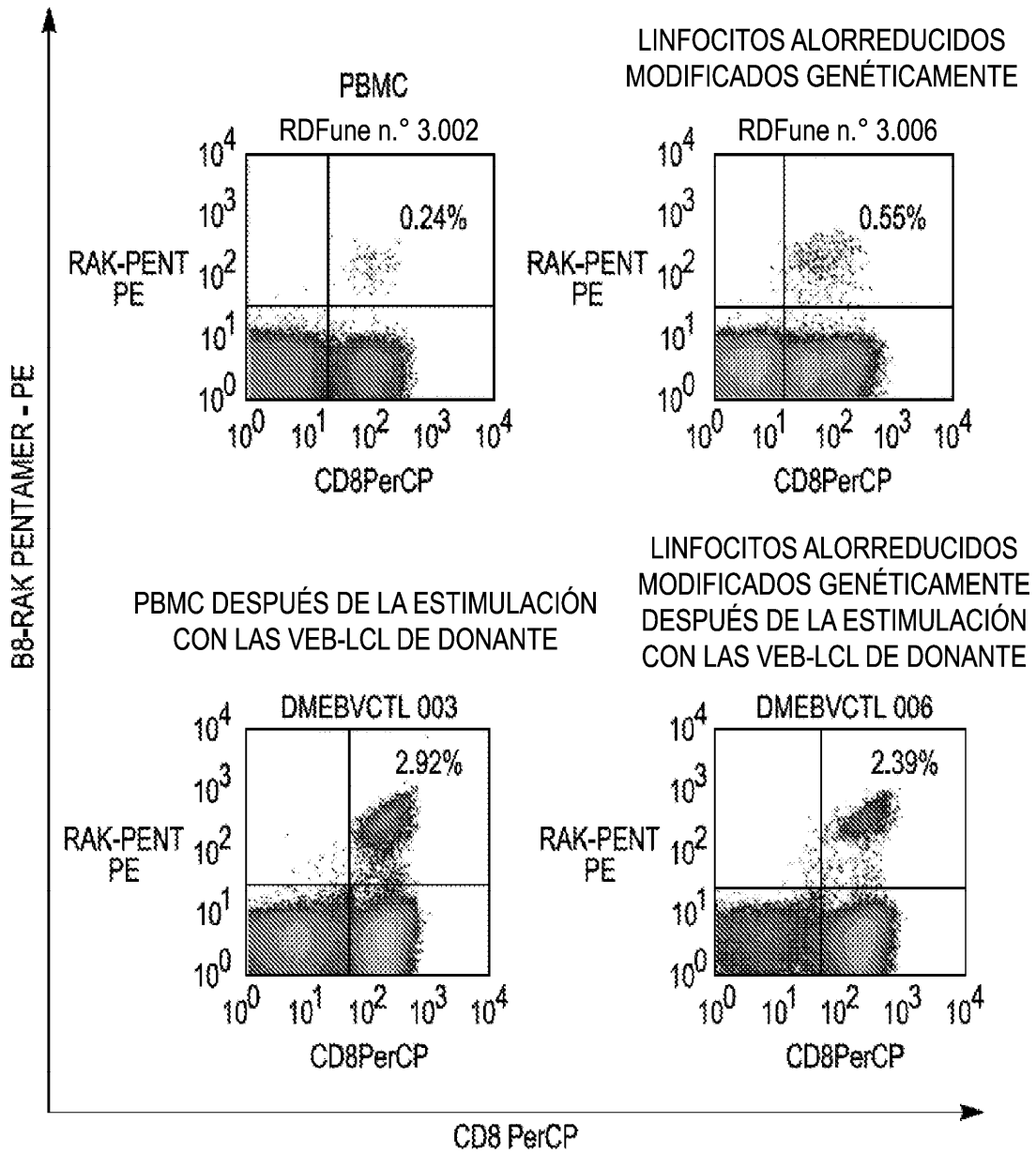
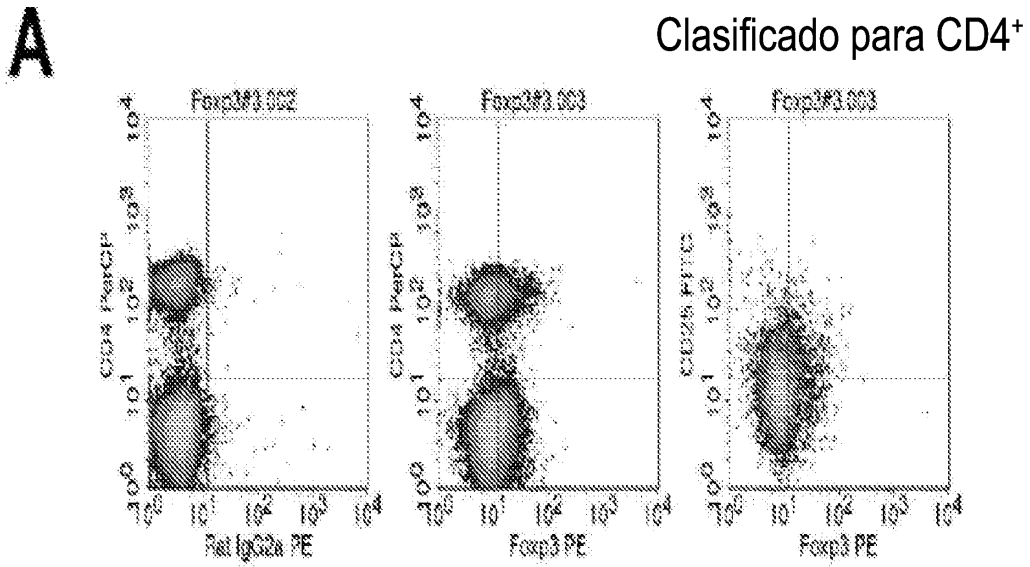


FIG. 11C



Clasificados para la población
negativa para CD19

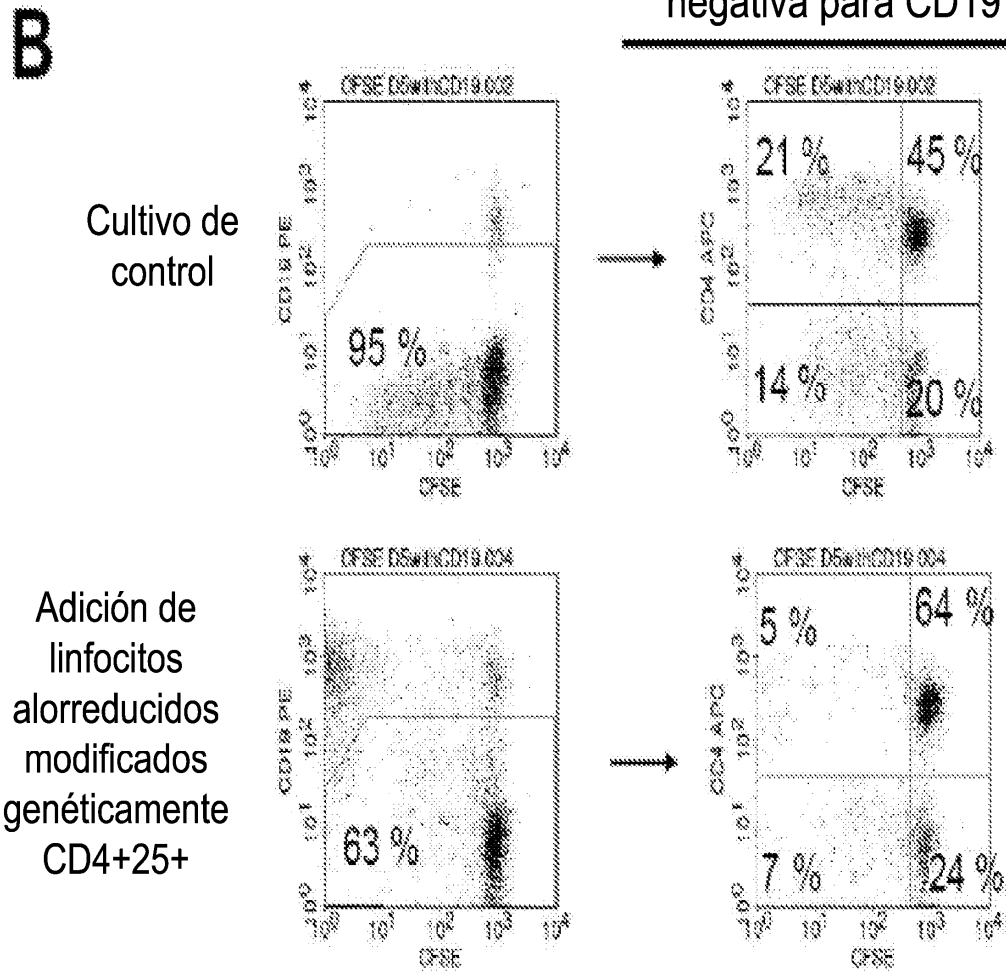


FIG. 12A y 12B

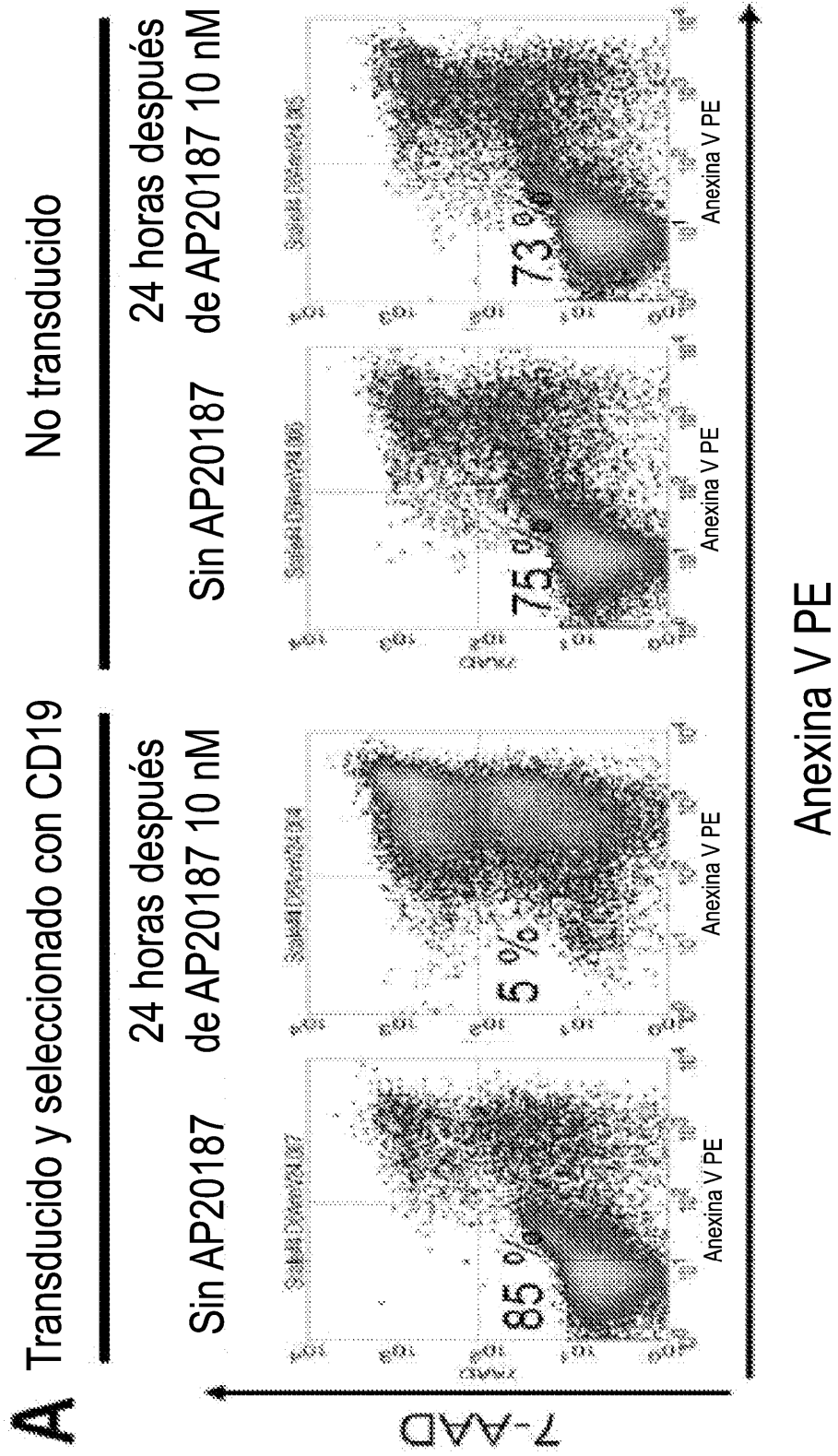


FIG. 13A

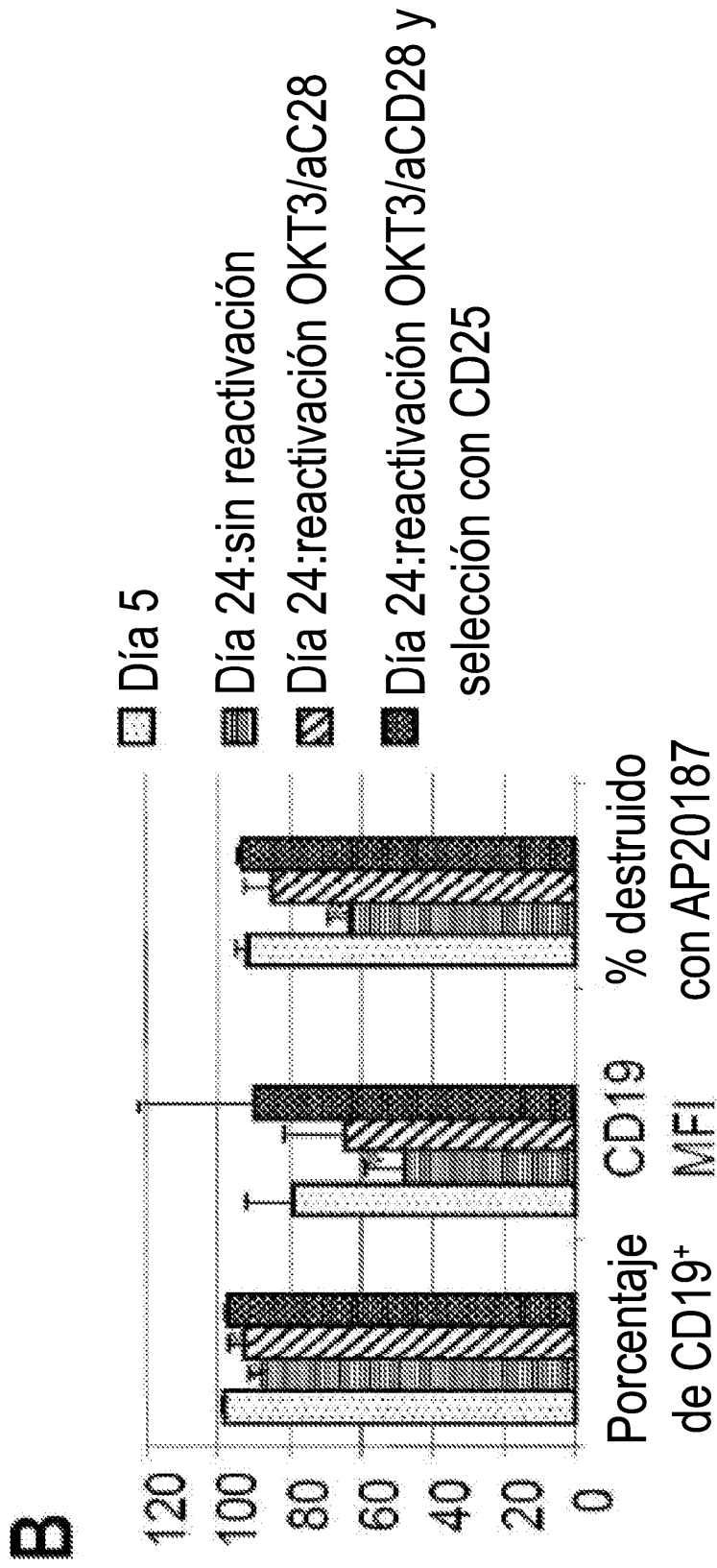


FIG. 13B

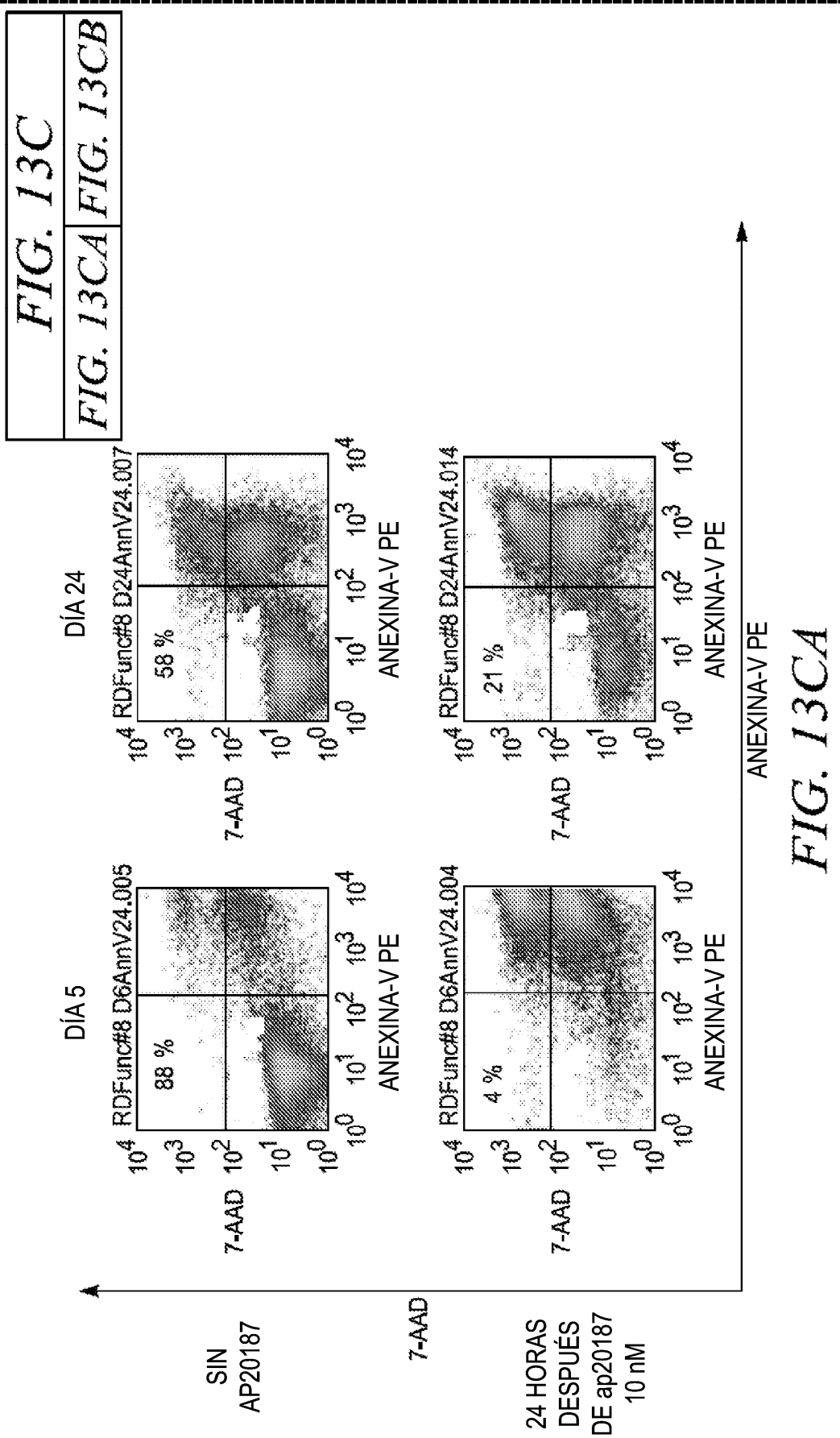


FIG. 13CA

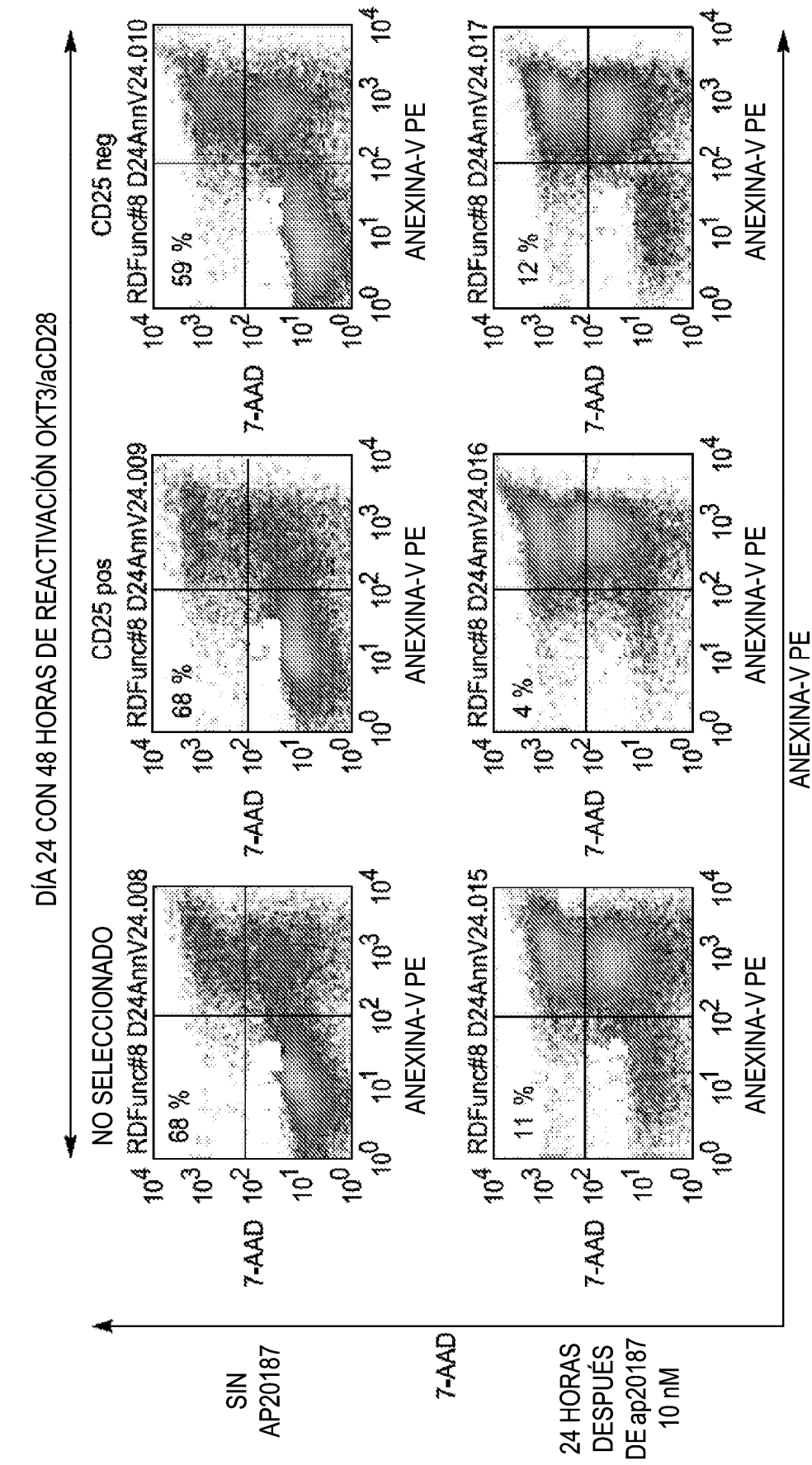


FIG. 13CB

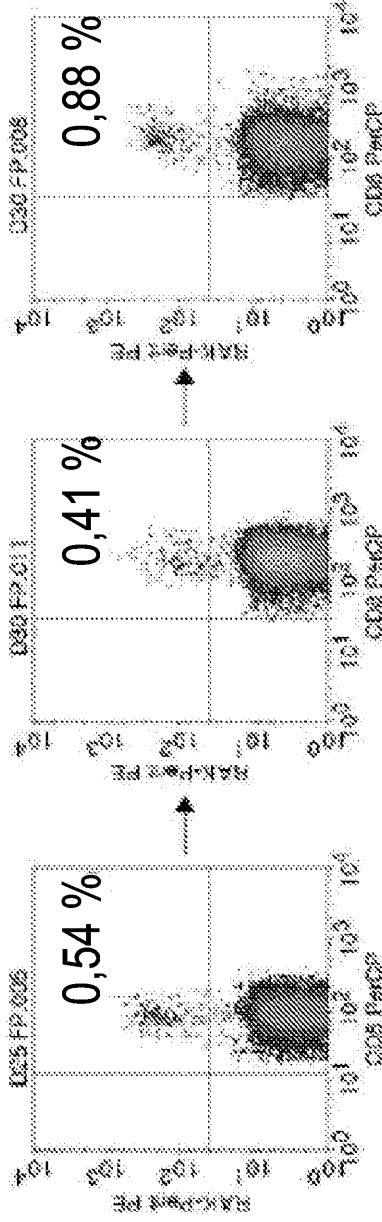
Después de la
aloestimulación
+ 24 horas de
AP20187

Después de la
aloestimulación

Antes de la
aloestimulación

A

Pentámero
HLA-B8-RAKFK
QLL
(EBV-BZLF1)



B

Pentámero
HLA-A2-NLVPM
VATV
(CMV-pp65)

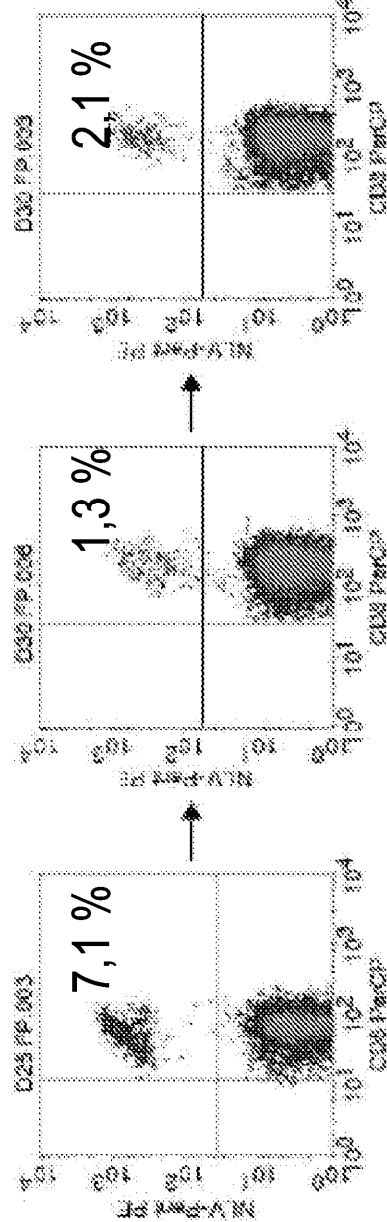


FIG. 14A Y 14B

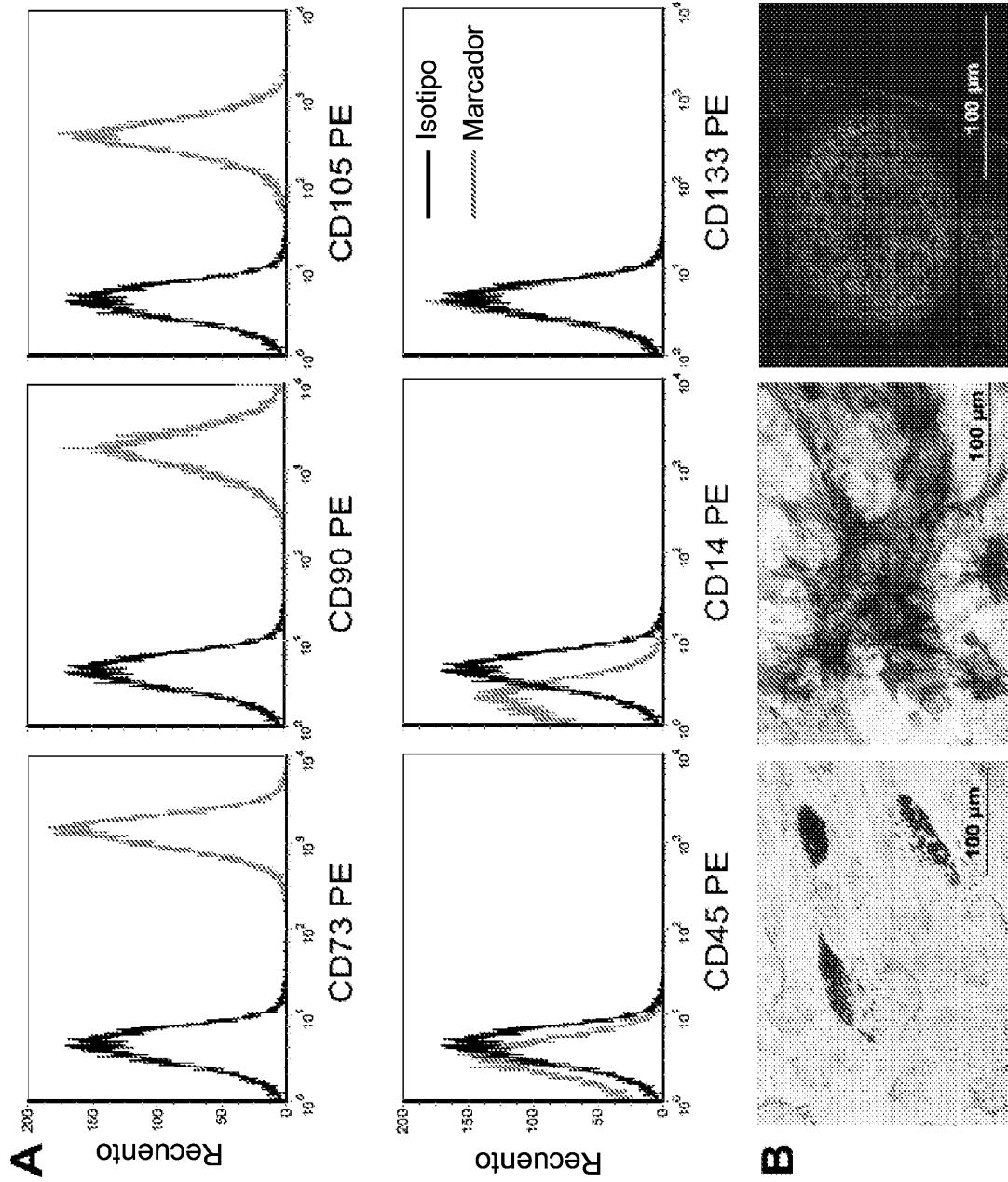


FIG. 15A Y 15B

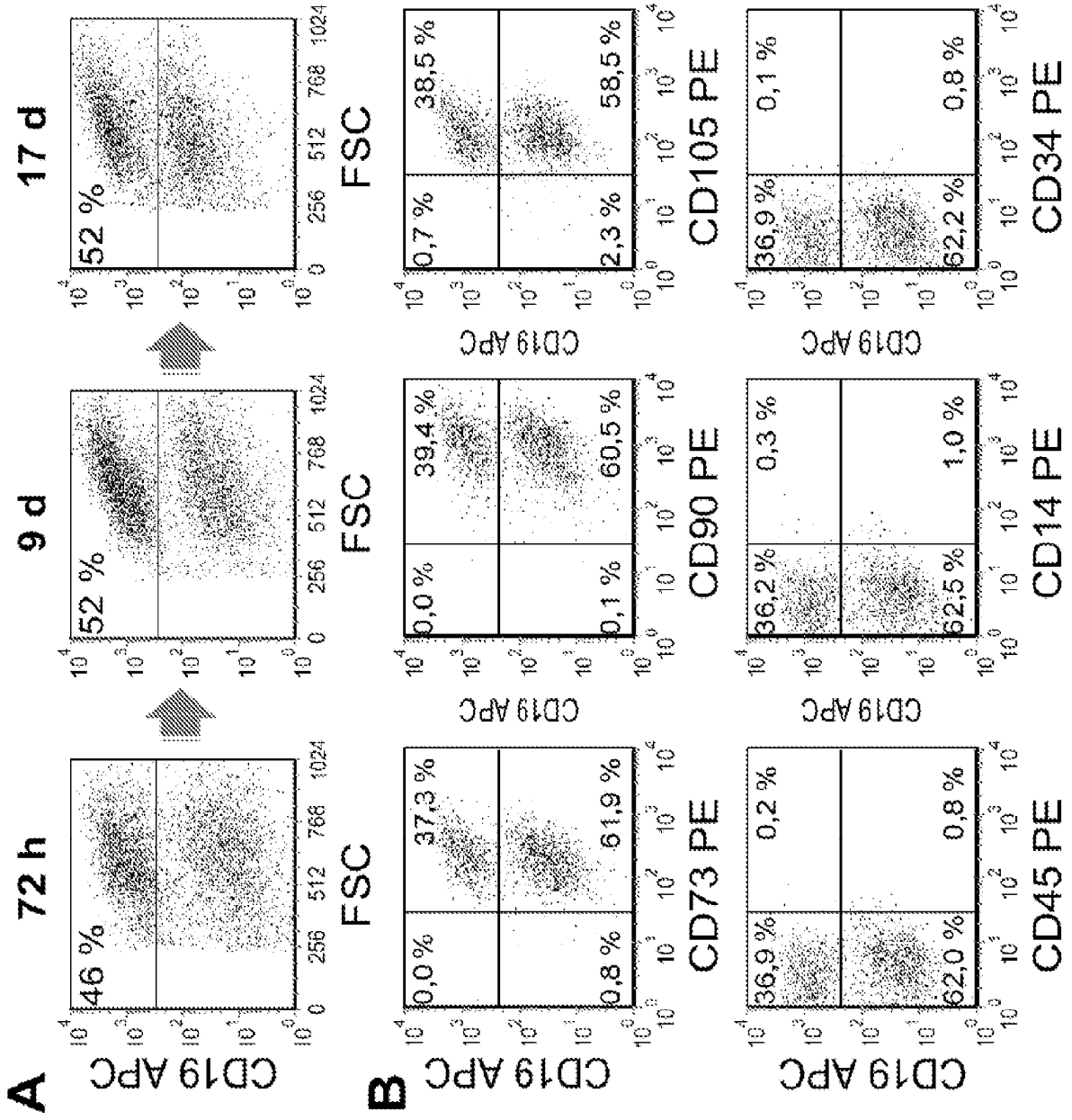


FIG. 16A

FIG. 16B

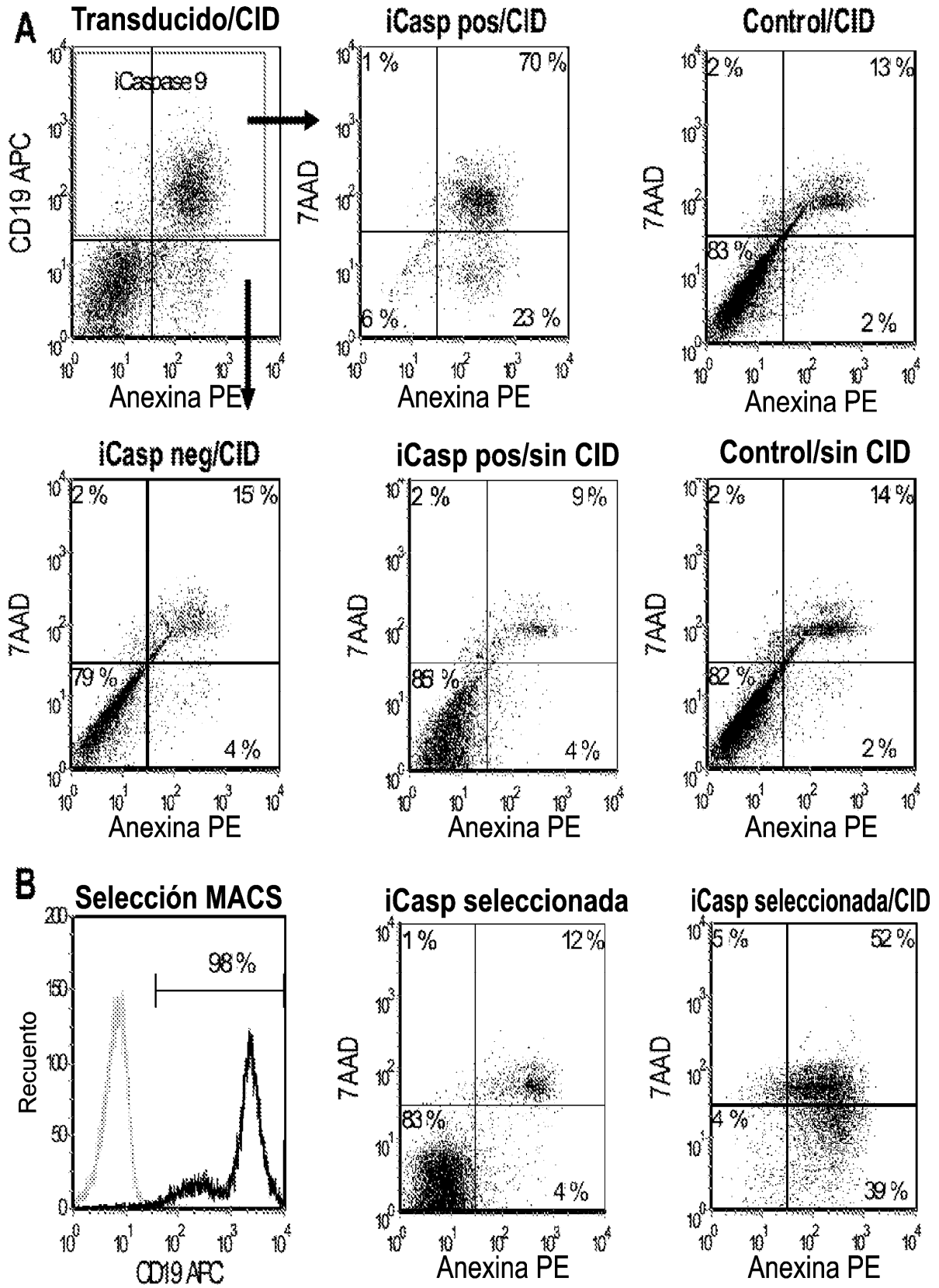


FIG. 17A y 17B

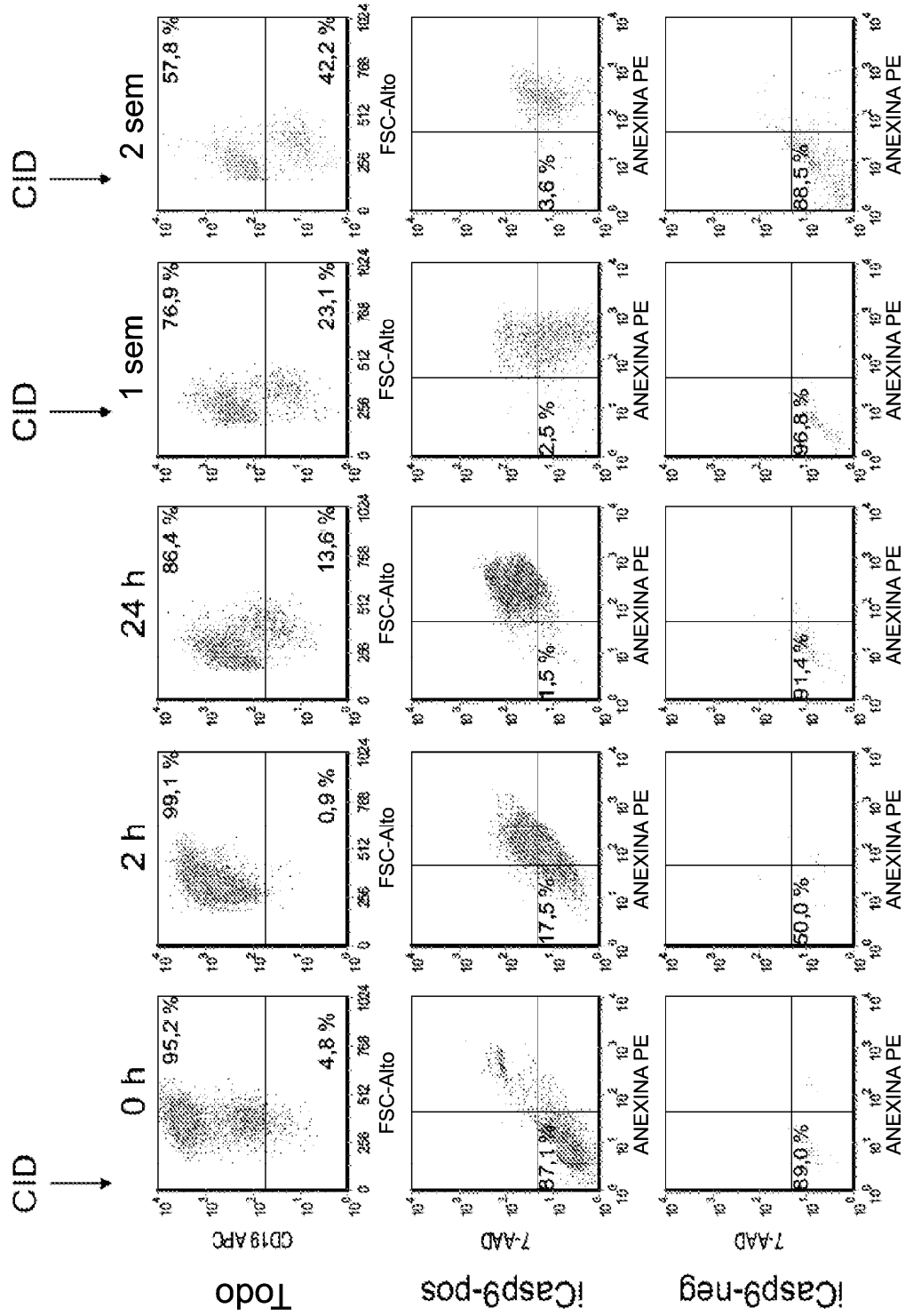


FIG. 18

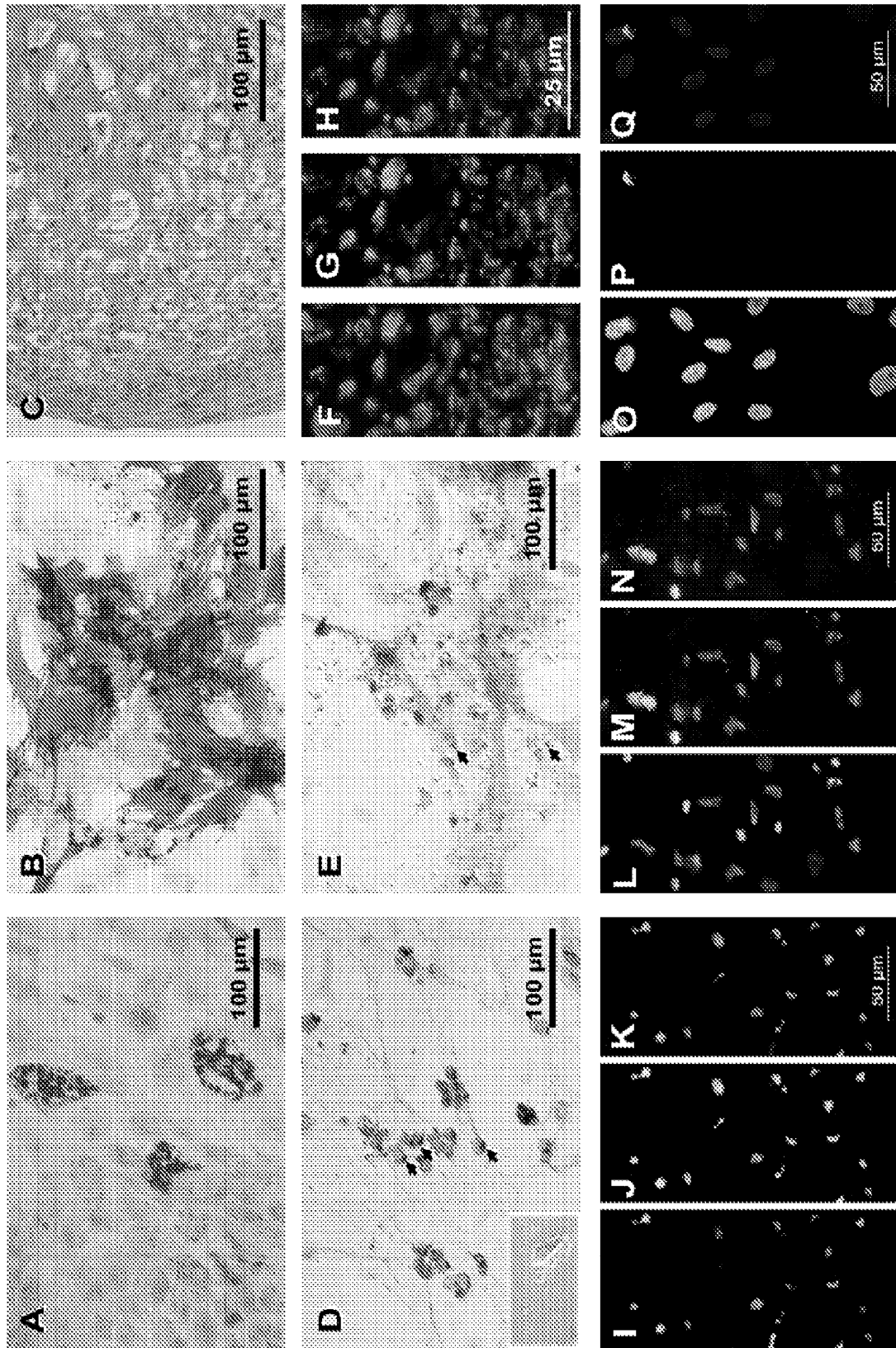


FIG. 19 Panels A-Q

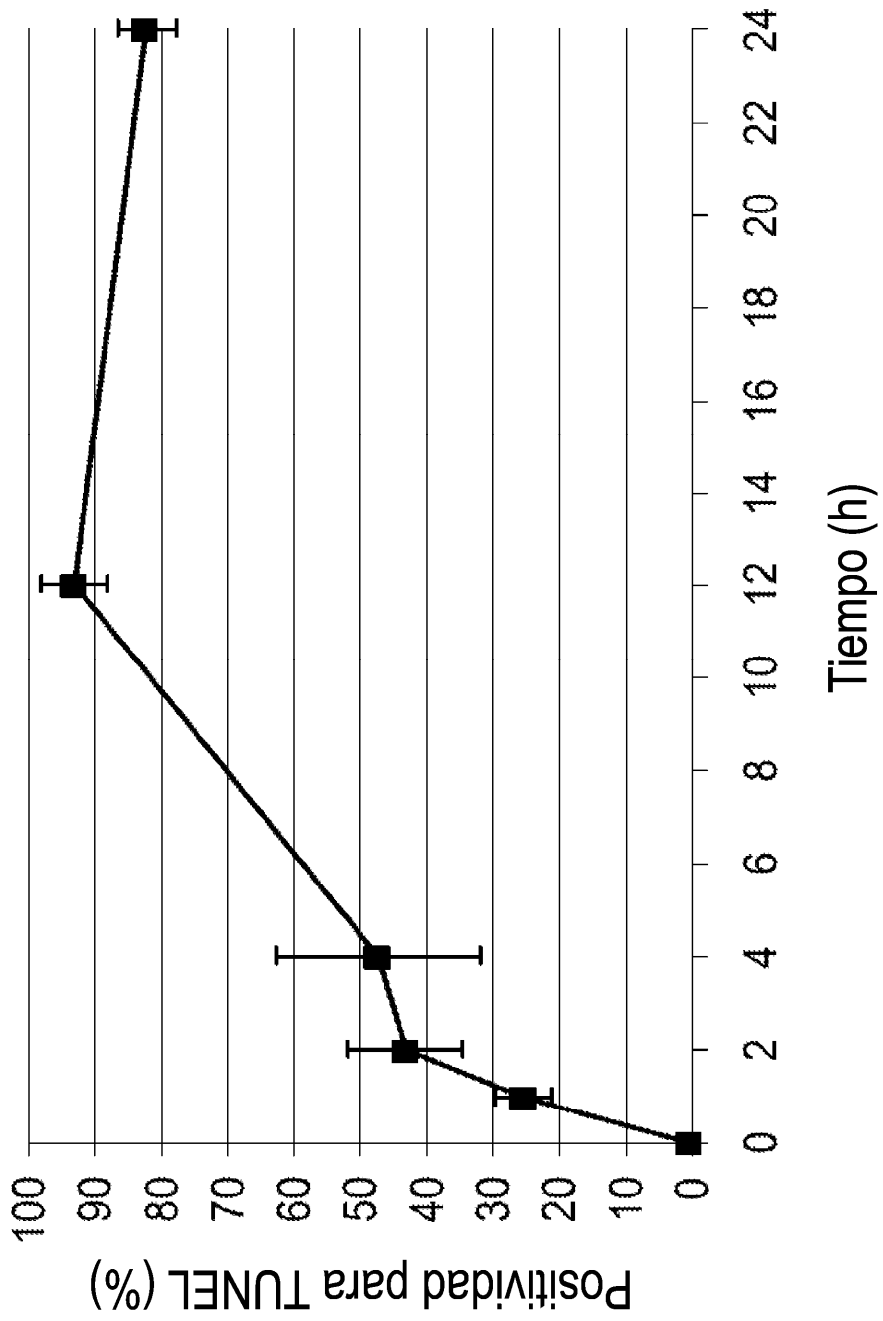


FIG. 20

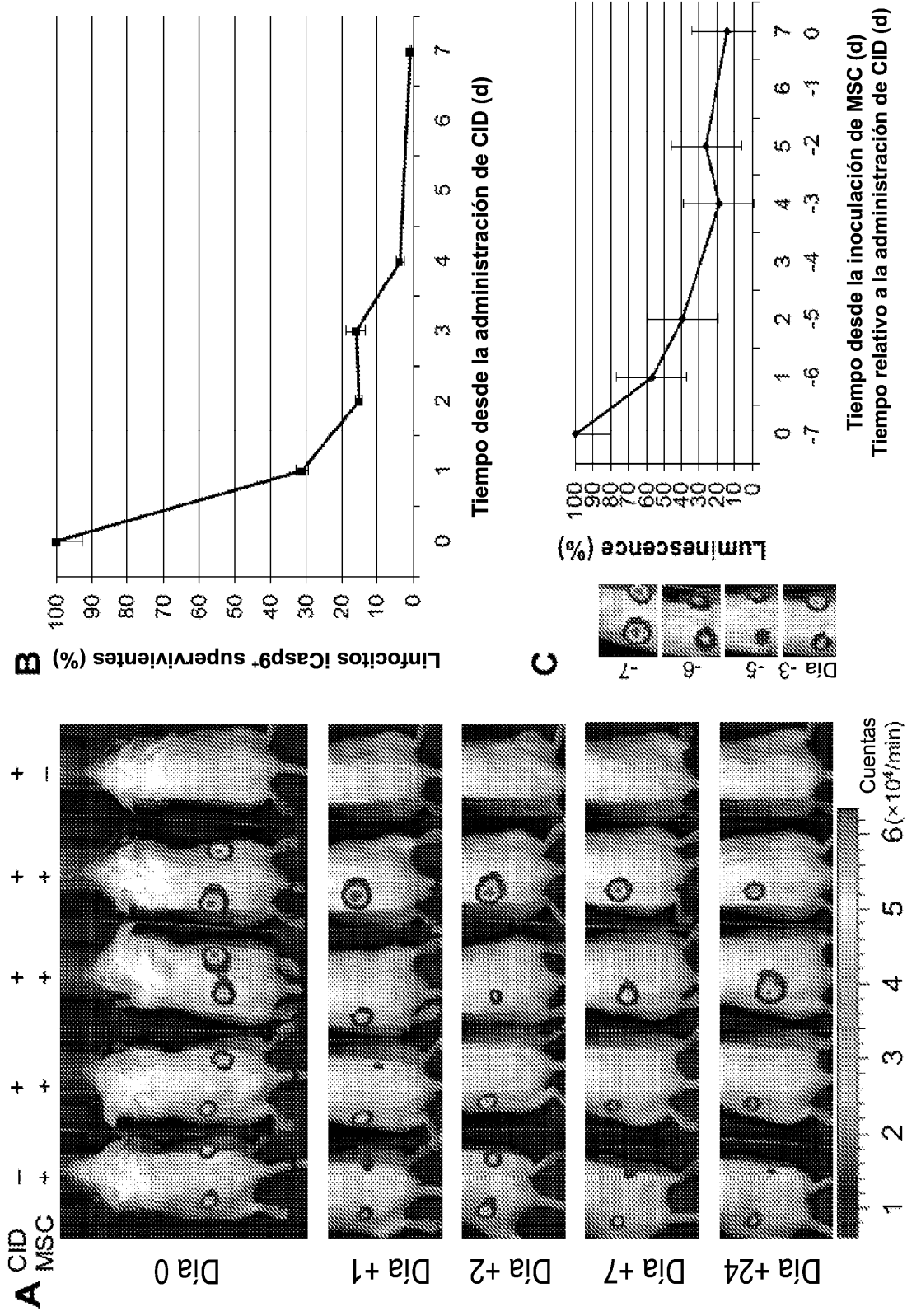


FIG. 21A, 21B Y 21C

API 903 induce la dimerización del gen suicida iCasp9, dando como resultado la apoptosis celular.

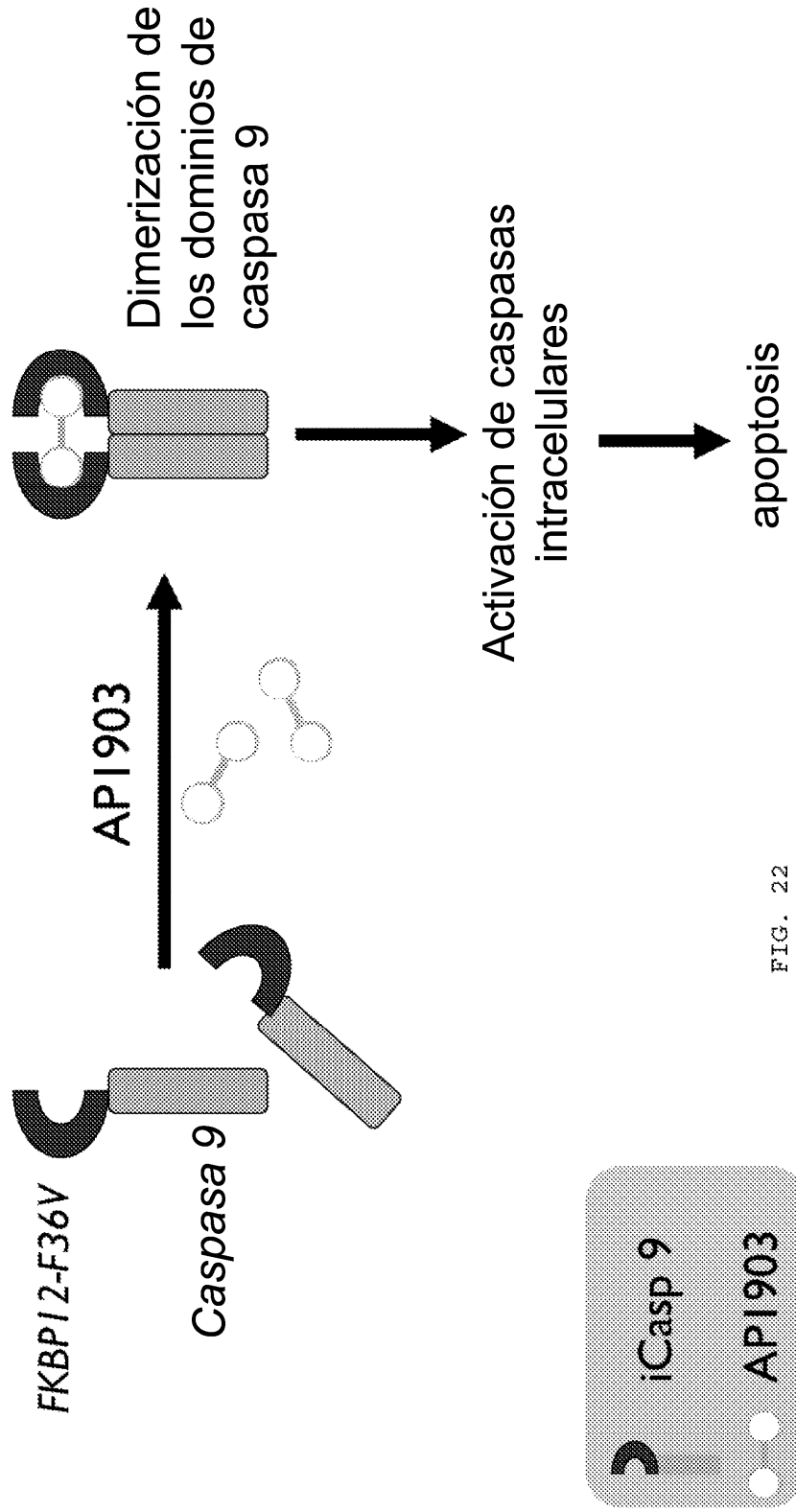


FIG. 22

Revisión del protocolo

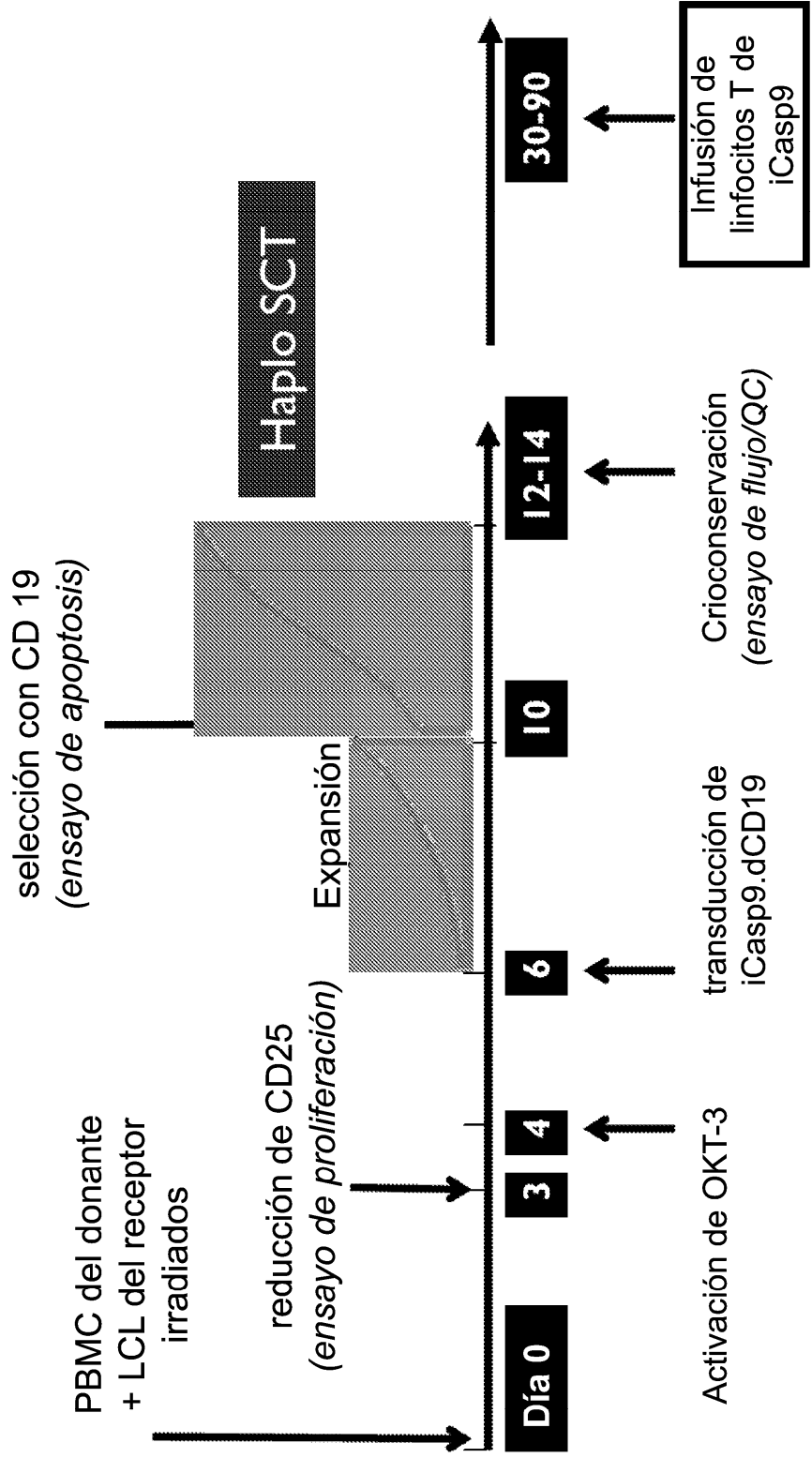


FIG. 23

Enriquecimiento de Δ CD19 en Clinimacs de linfocitos T alorreducidos iCasp9 hasta > 90 % de pureza

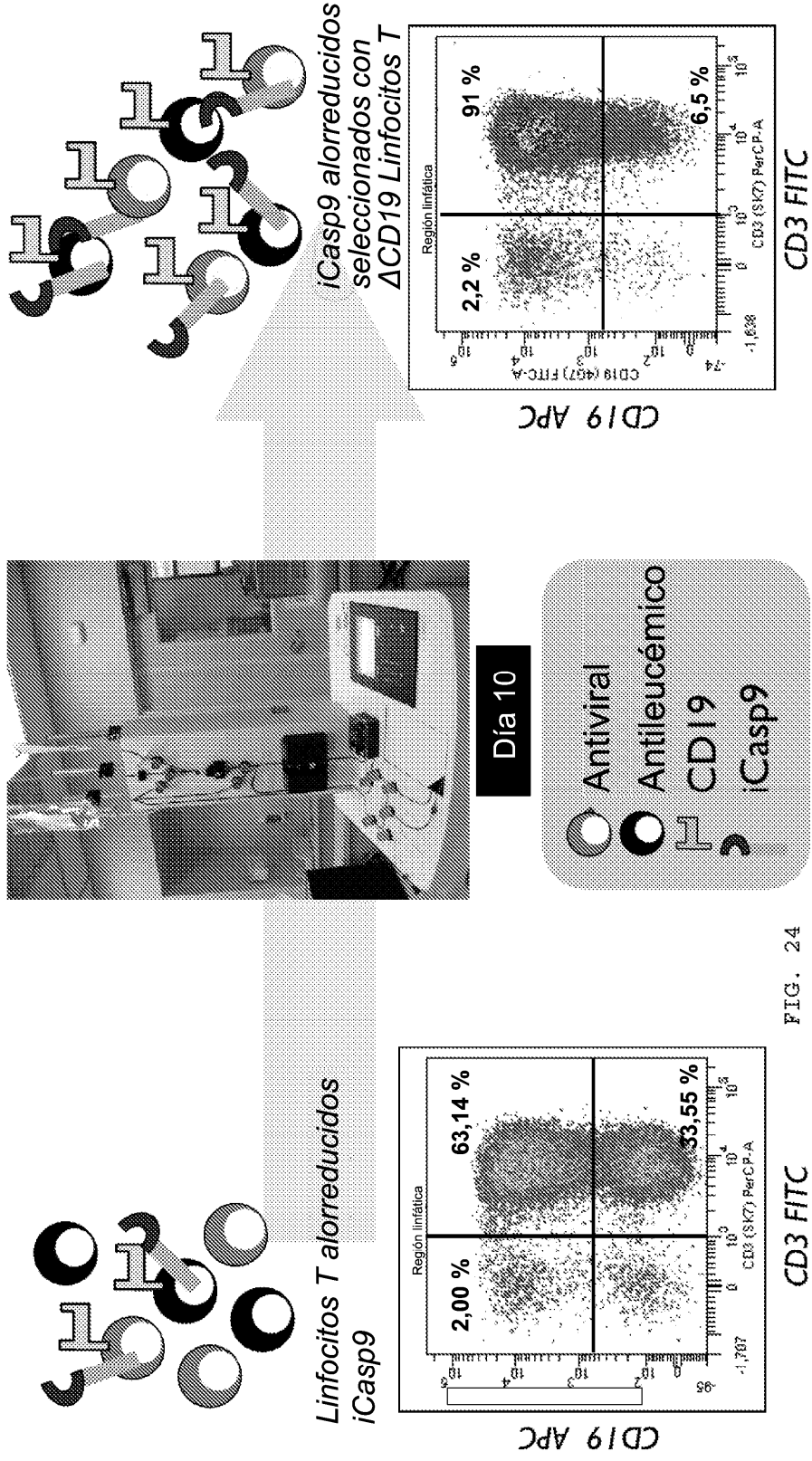
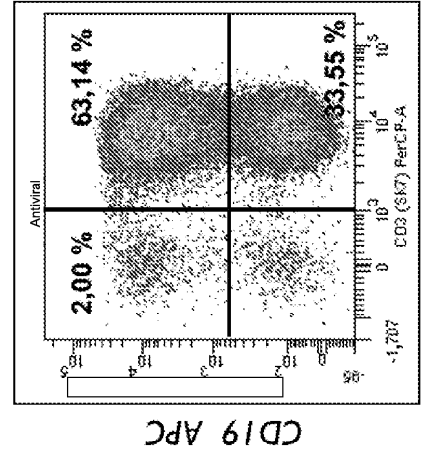
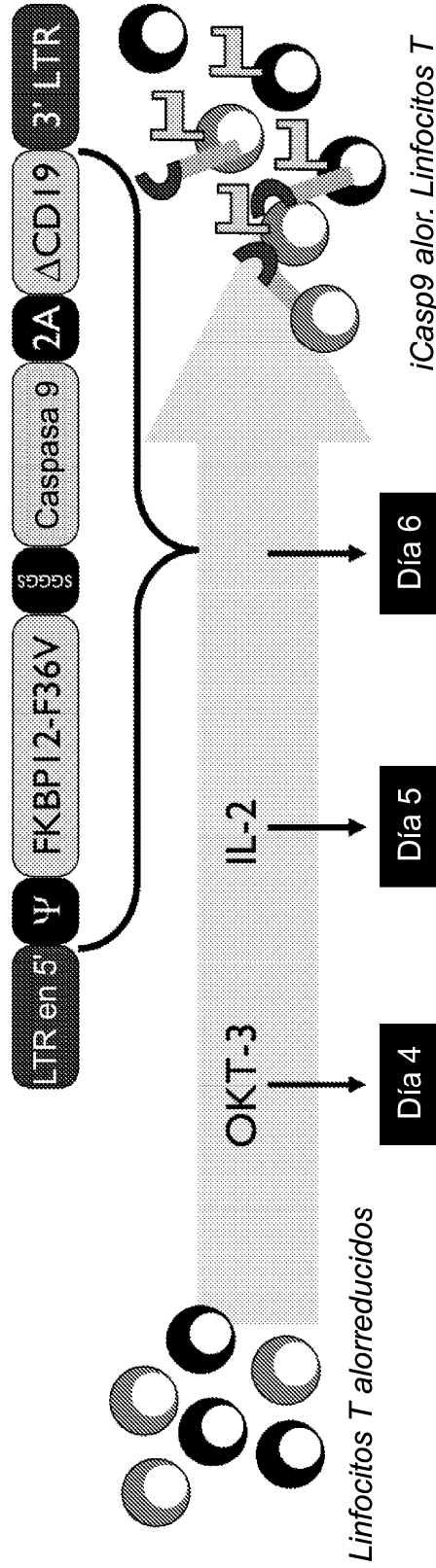


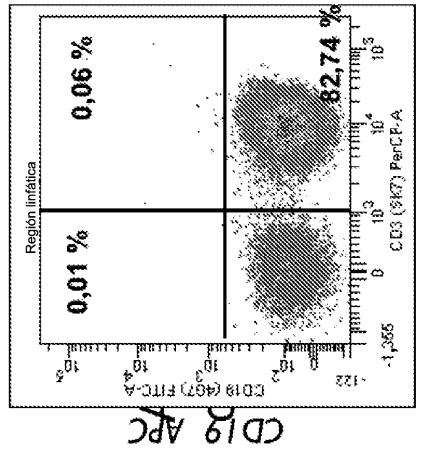
FIG. 24

Equipar los linfocitos T con el gen suicida iCasp9 y el marcador de selección ΔCD19



Legend for flow cytometry plots:

- Antiviral (hatched circle)
- Antileucémico (white circle)
- CD19 (rectangle)
- iCasp9* (circle)



CD3 FITC

FIG. 25

CD3 FITC

AP1903 elimina eficazmente los linfocitos T modificados con el gen suicida iCasp9

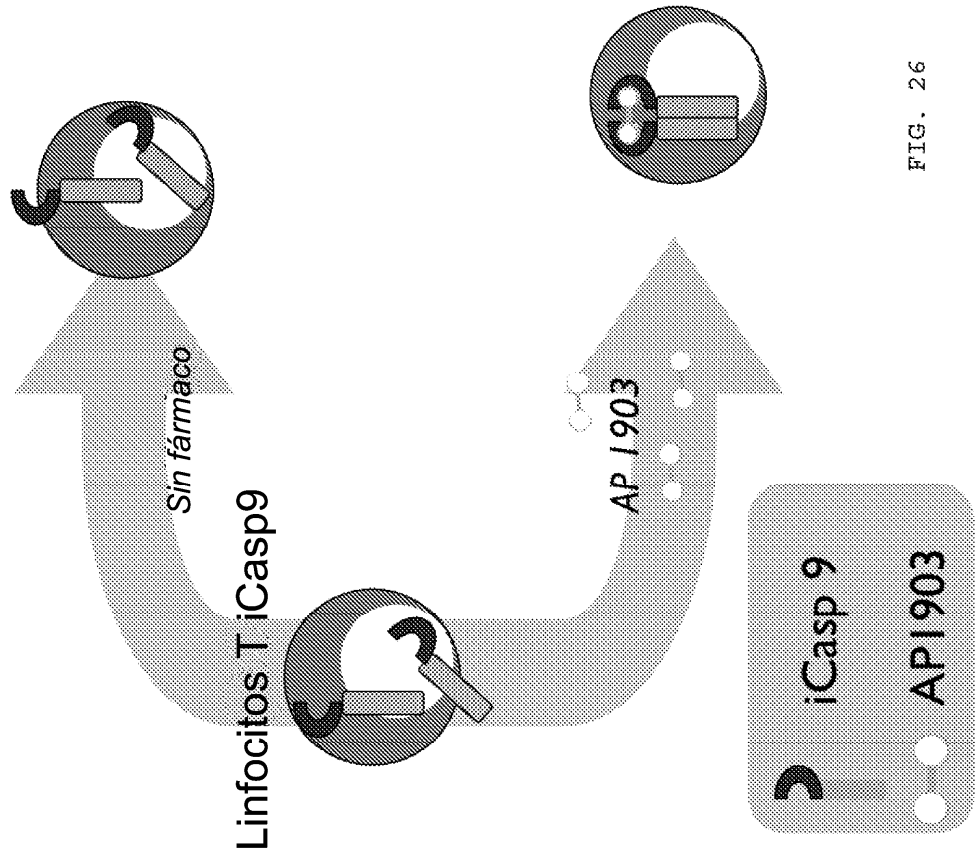


FIG. 26

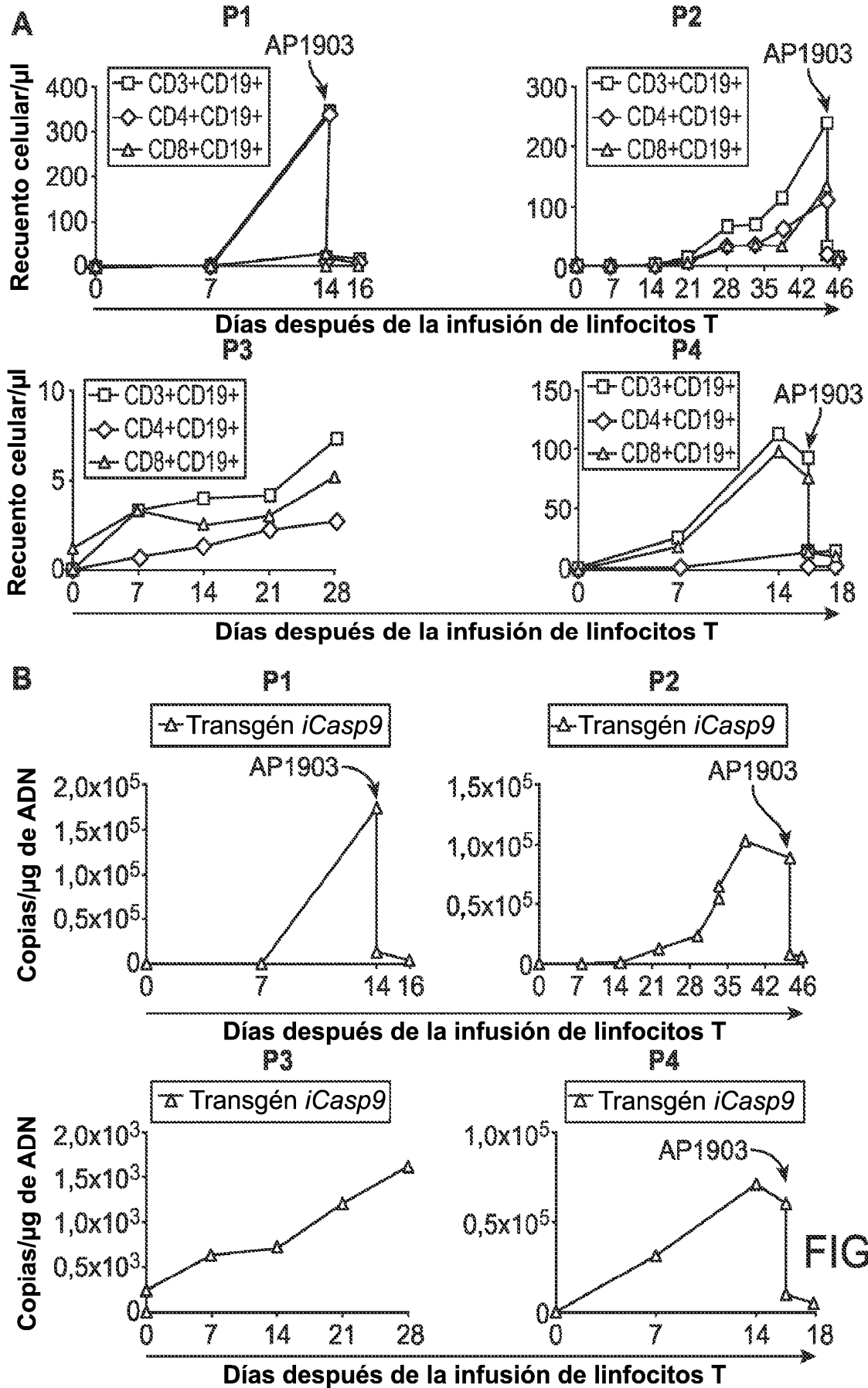


FIG. 27

Expansión de los linfocitos T transducidos con iCasp9 (Pt 1)

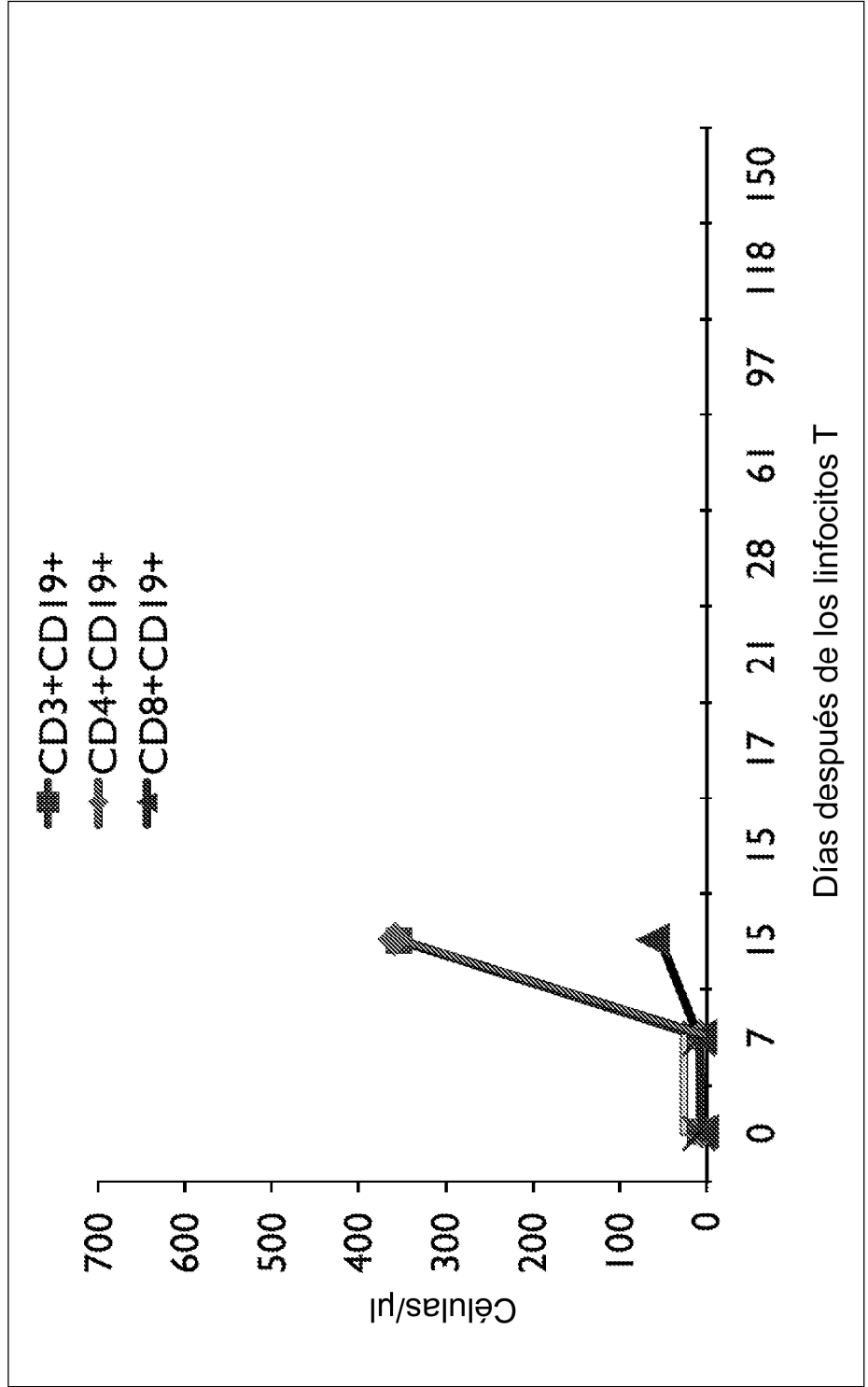


FIG. 28

Expansión de los linfocitos T transducidos con iCasp9 (Pt 2)

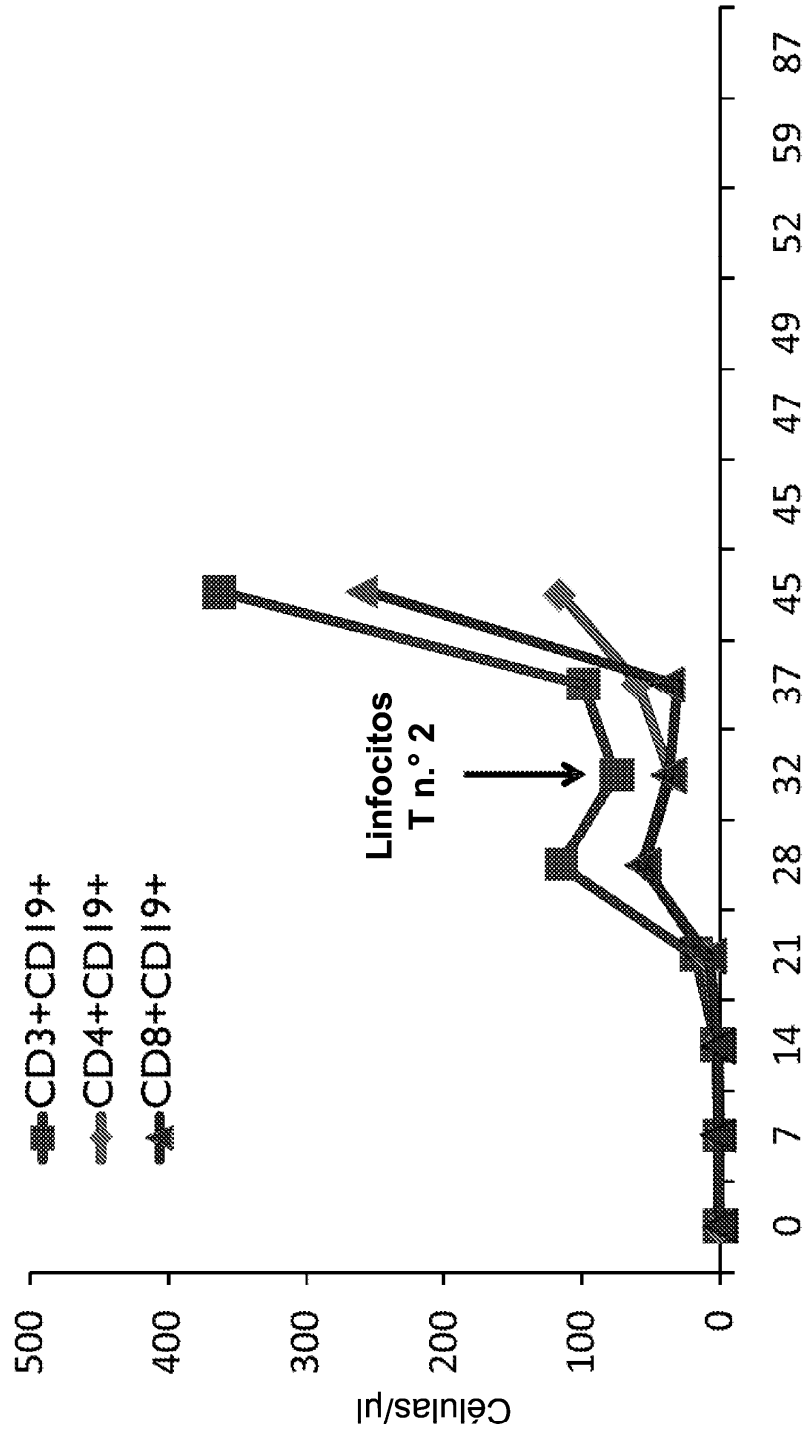


FIG. 29
Días después de los linfocitos T

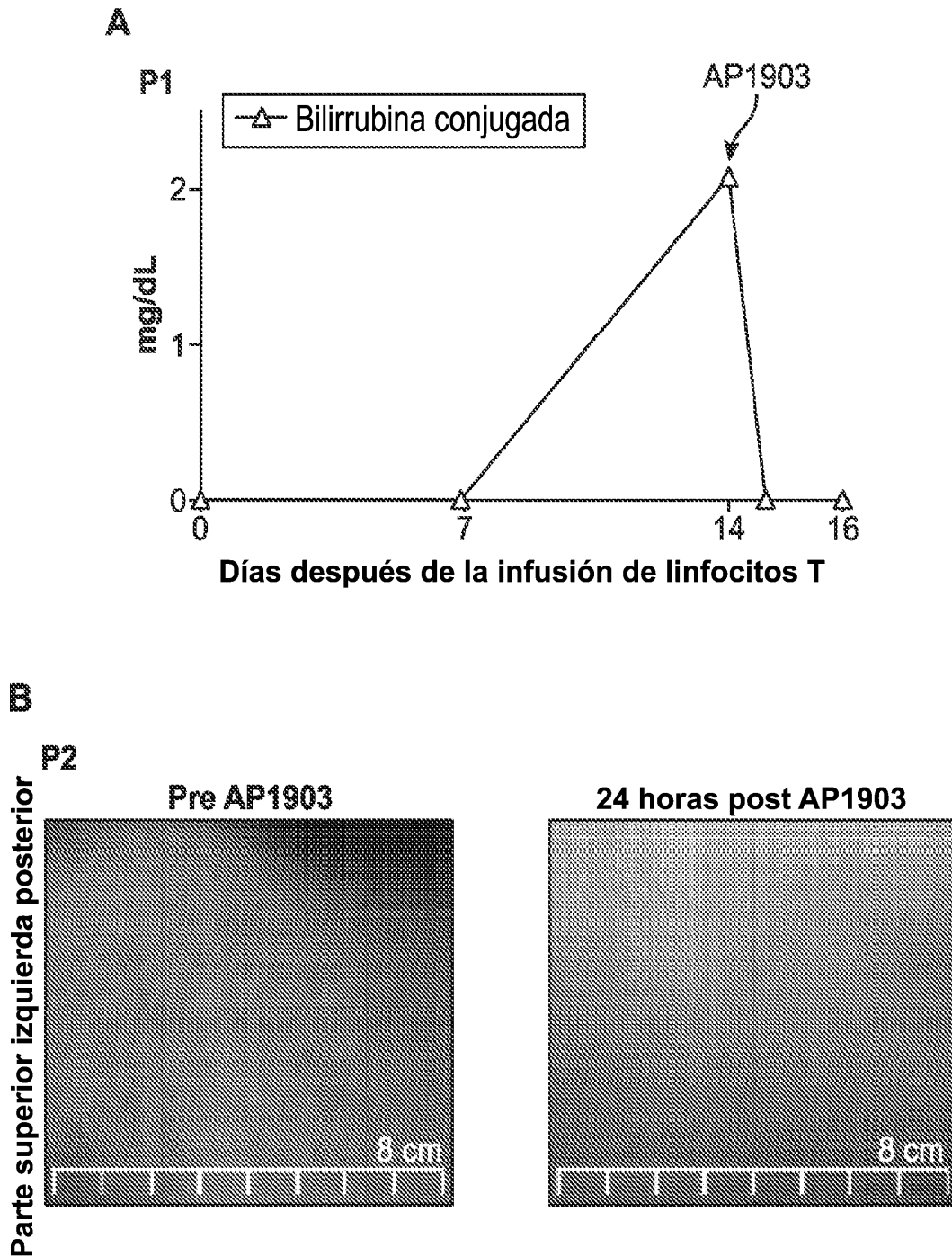
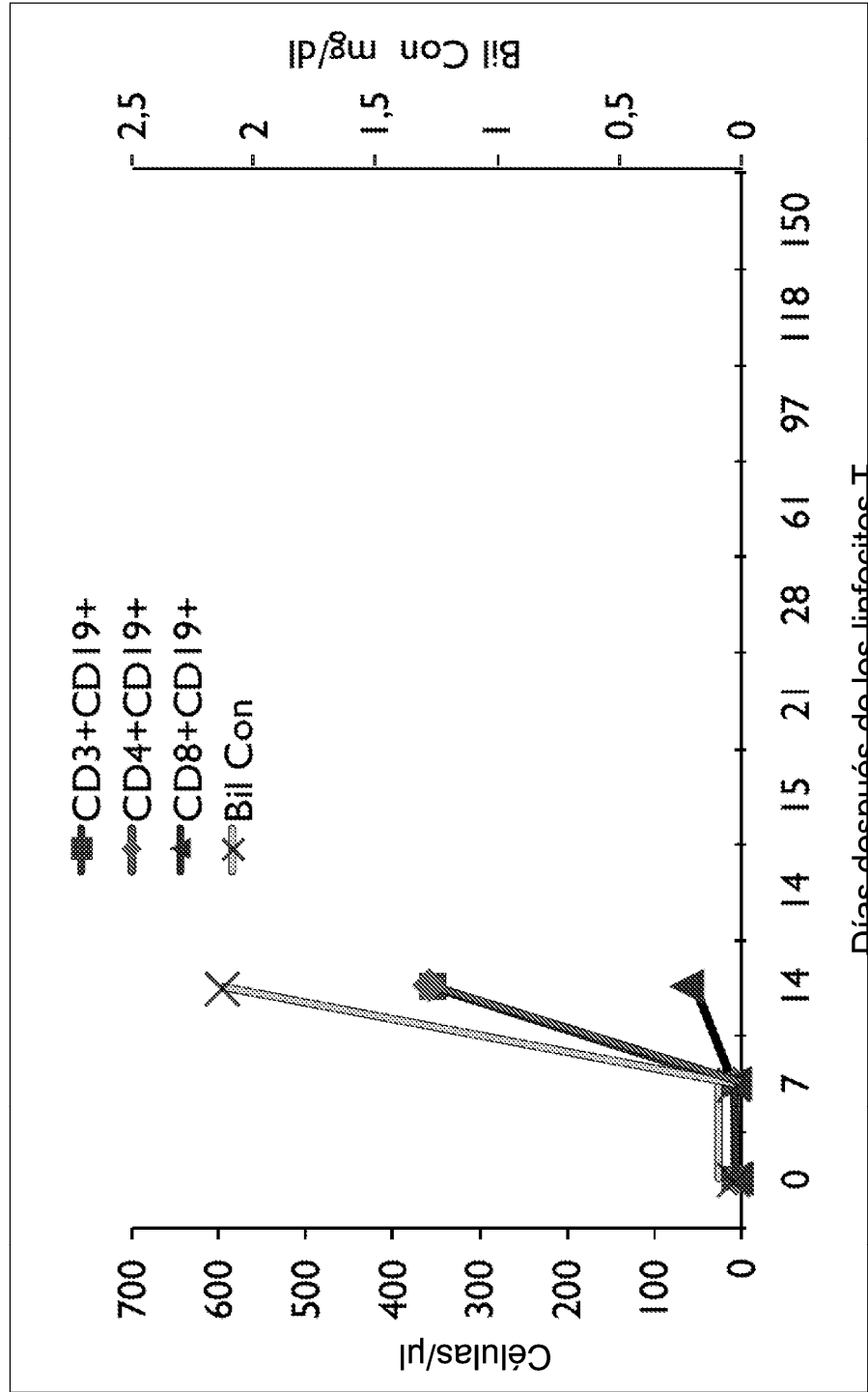


FIG. 30

GvHD hepática aguda de grado 2 tras expansión de los linfocitos T iCasp9 (Pt 1)



Días después de los linfocitos T

FIG. 31

GvHD cutánea aguda de grado 2 tras expansión de linfocitos T iCasp9 (Pt 2)

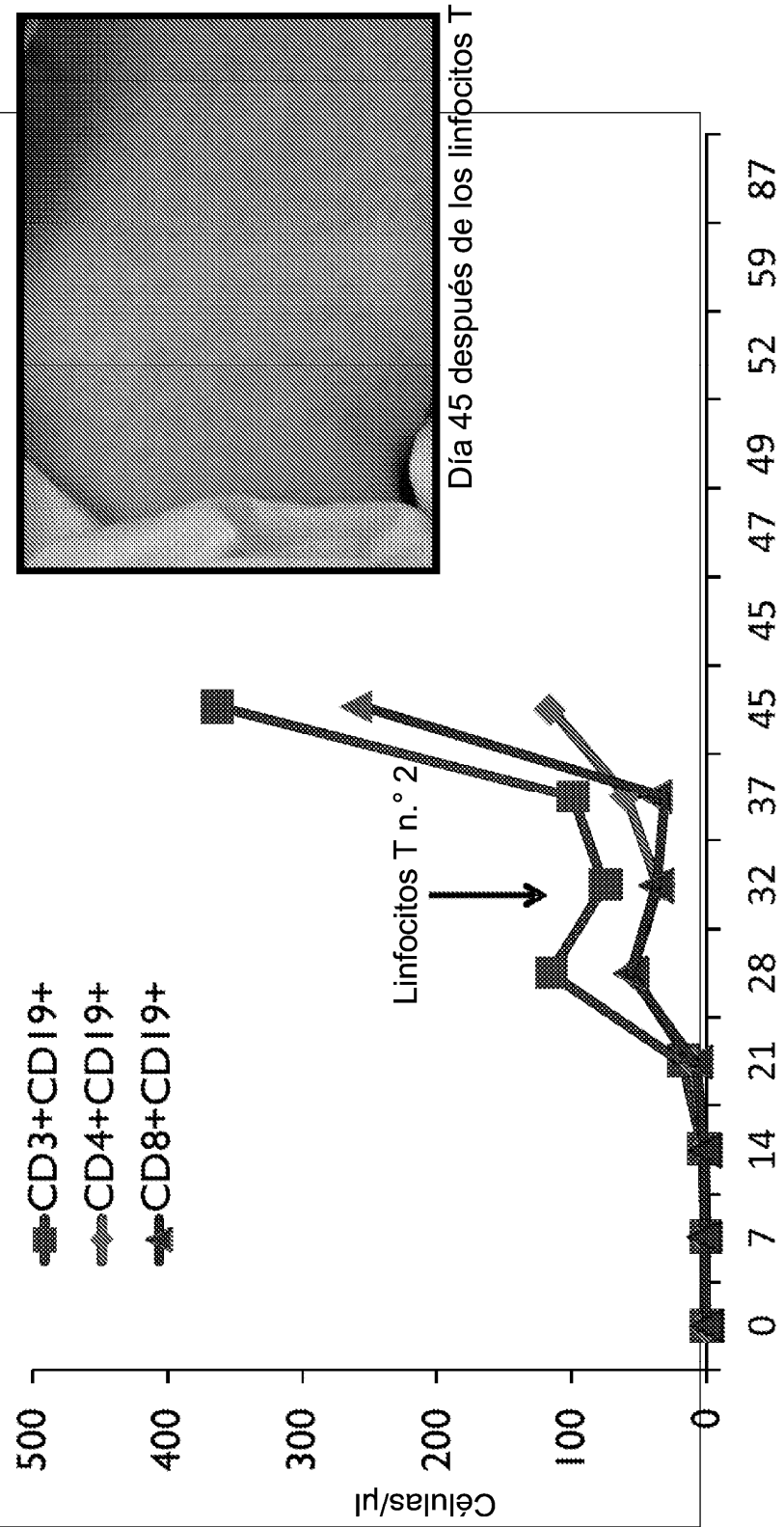


FIG. 32

Días después de los linfocitos T

AP 1903 elimina eficazmente linfocitos T iCasp9
(Pt 1)

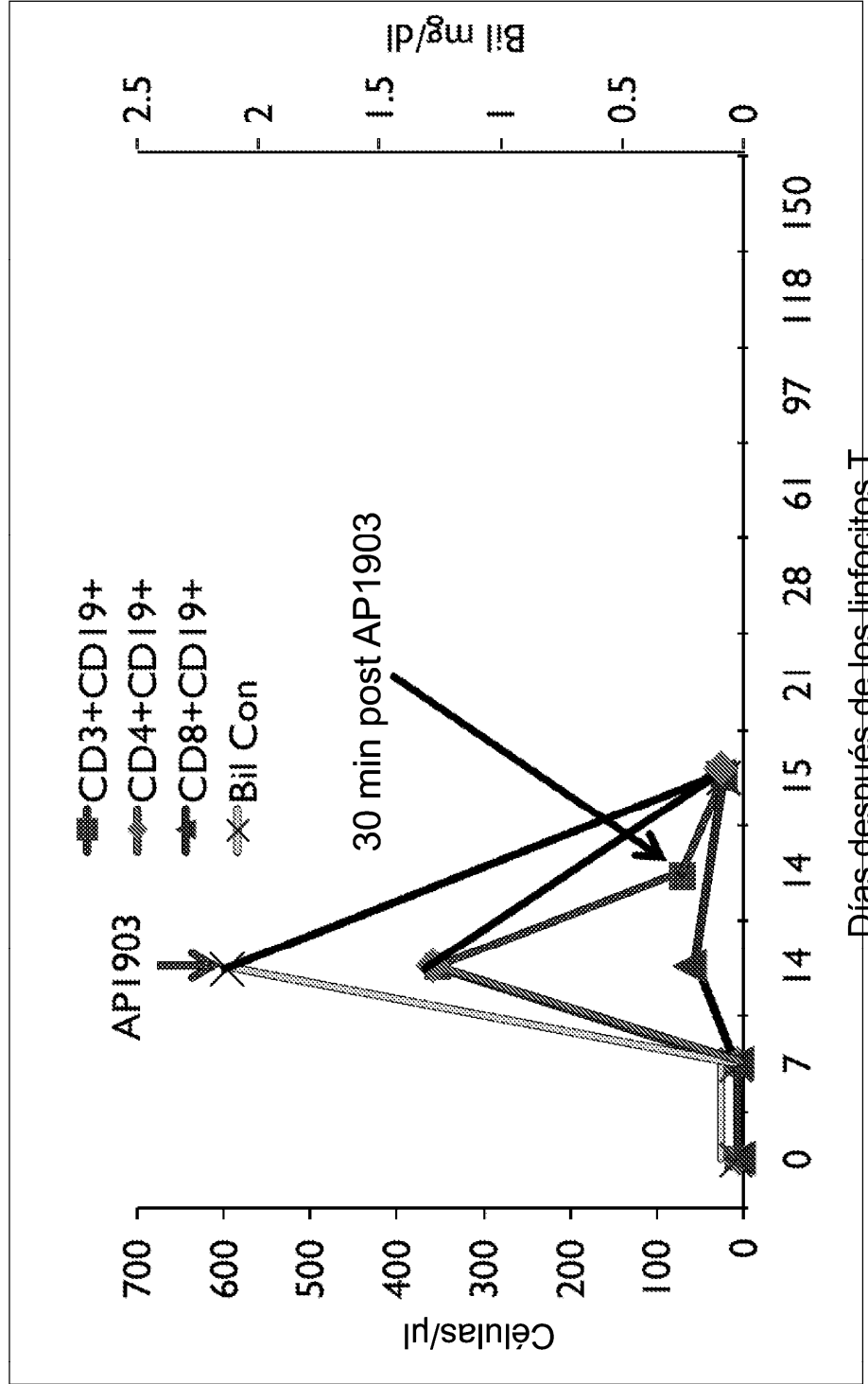


FIG. 33
Días después de los linfocitos T

AP 1903 elimina eficazmente linfocitos T iCasp9 (Pt 2)

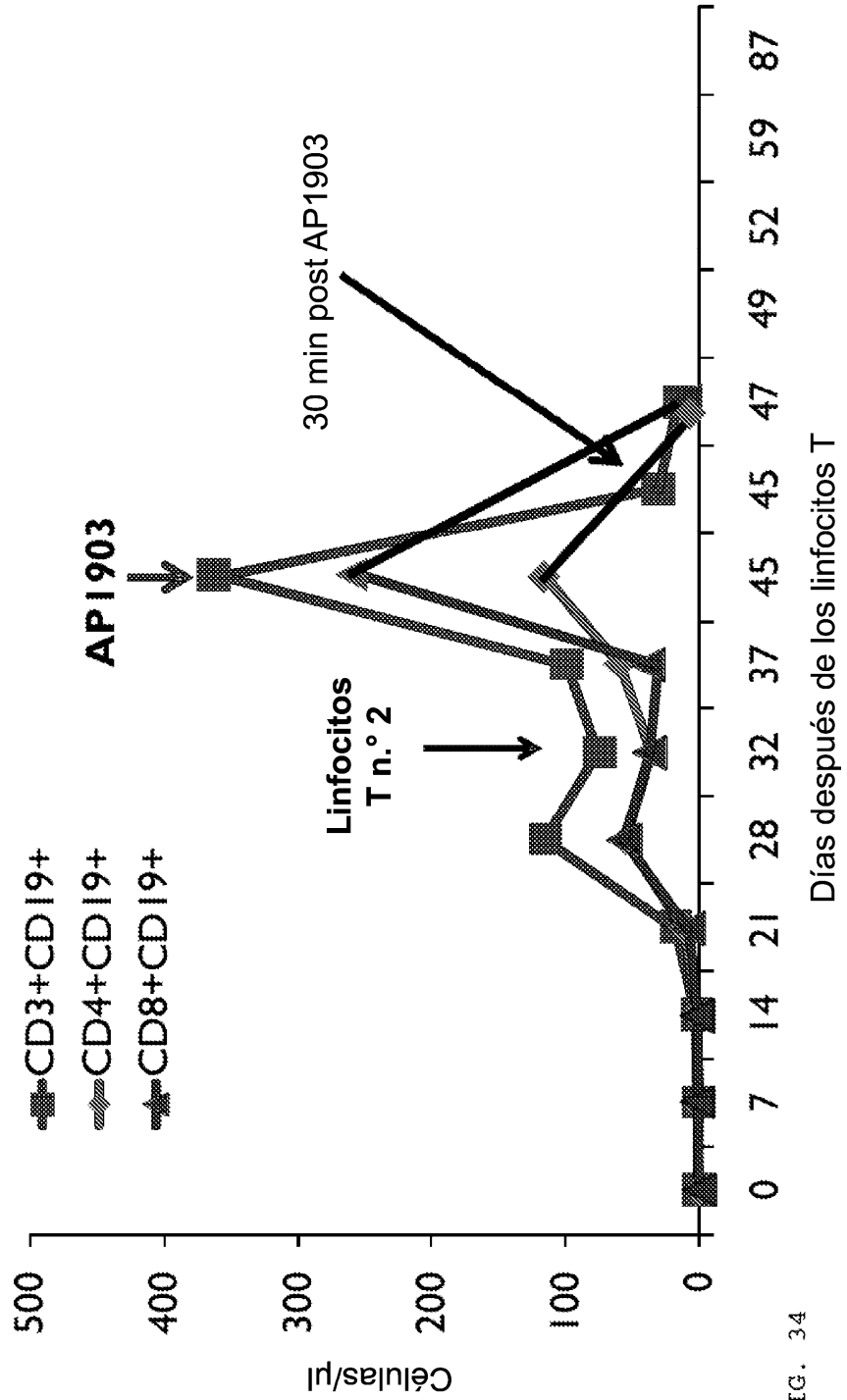
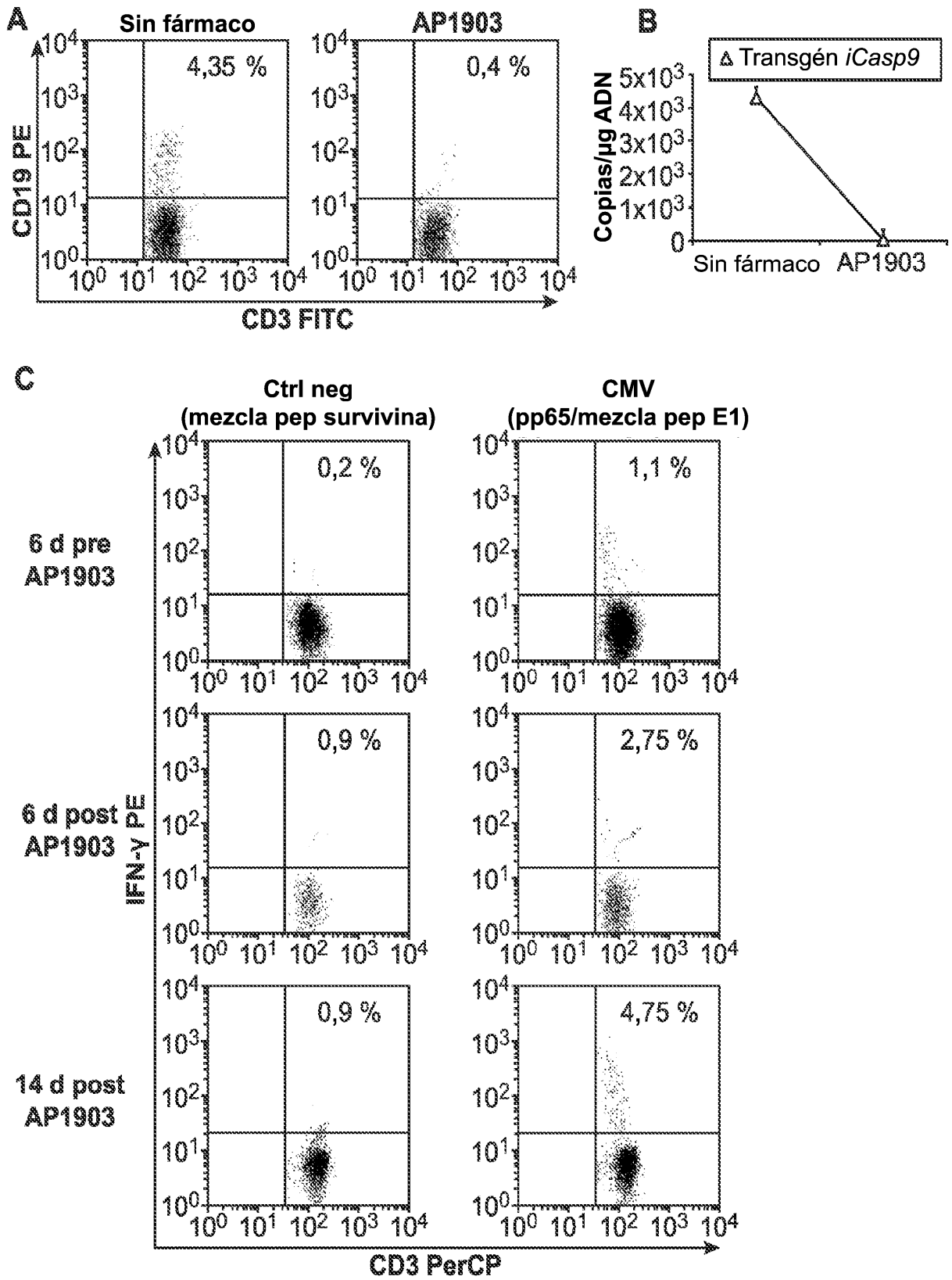


FIG. 34



Los linfocitos T alorreducidos iCasp9 pueden expandirse tras AP1903 sin signos de GvHd (Pt 1)

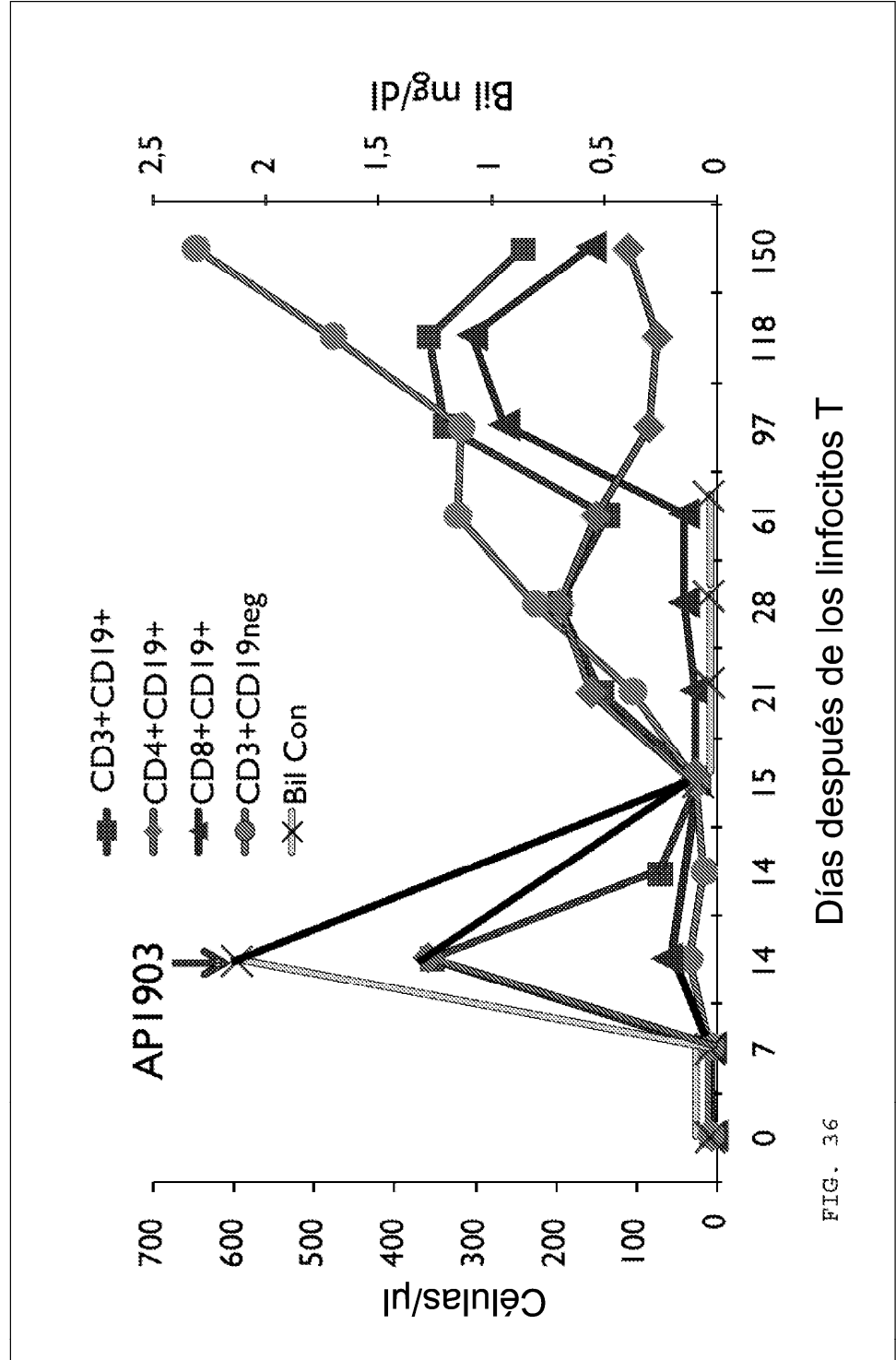


FIG. 36 Días después de los linfocitos T

Reconstrucción de linfocitos no tratados de memoria central y efectores tras infusión (pt 1)

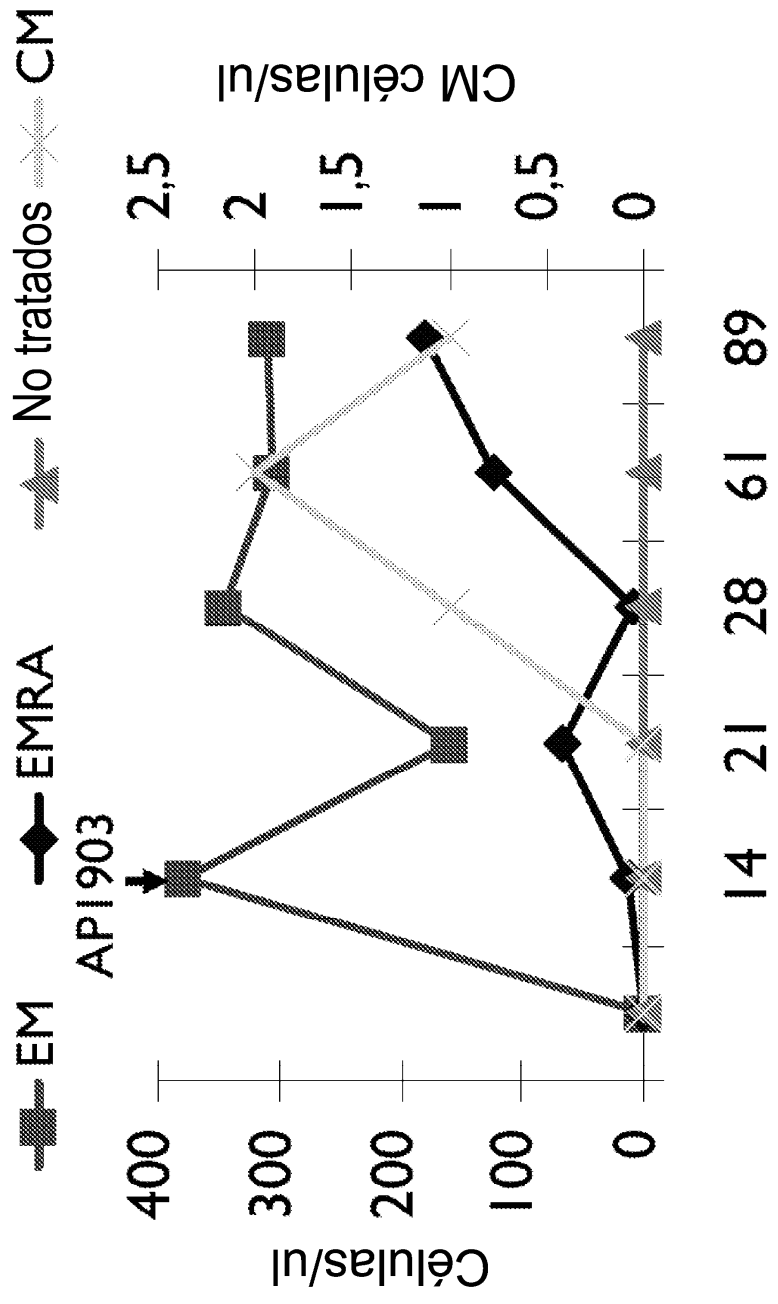


FIG. 37 Días después de la infusión de linfocitos T

Los linfocitos T alorreducidos iCasp9 pueden expandirse tras AP1903 sin signos de GvHd (Pt 2)

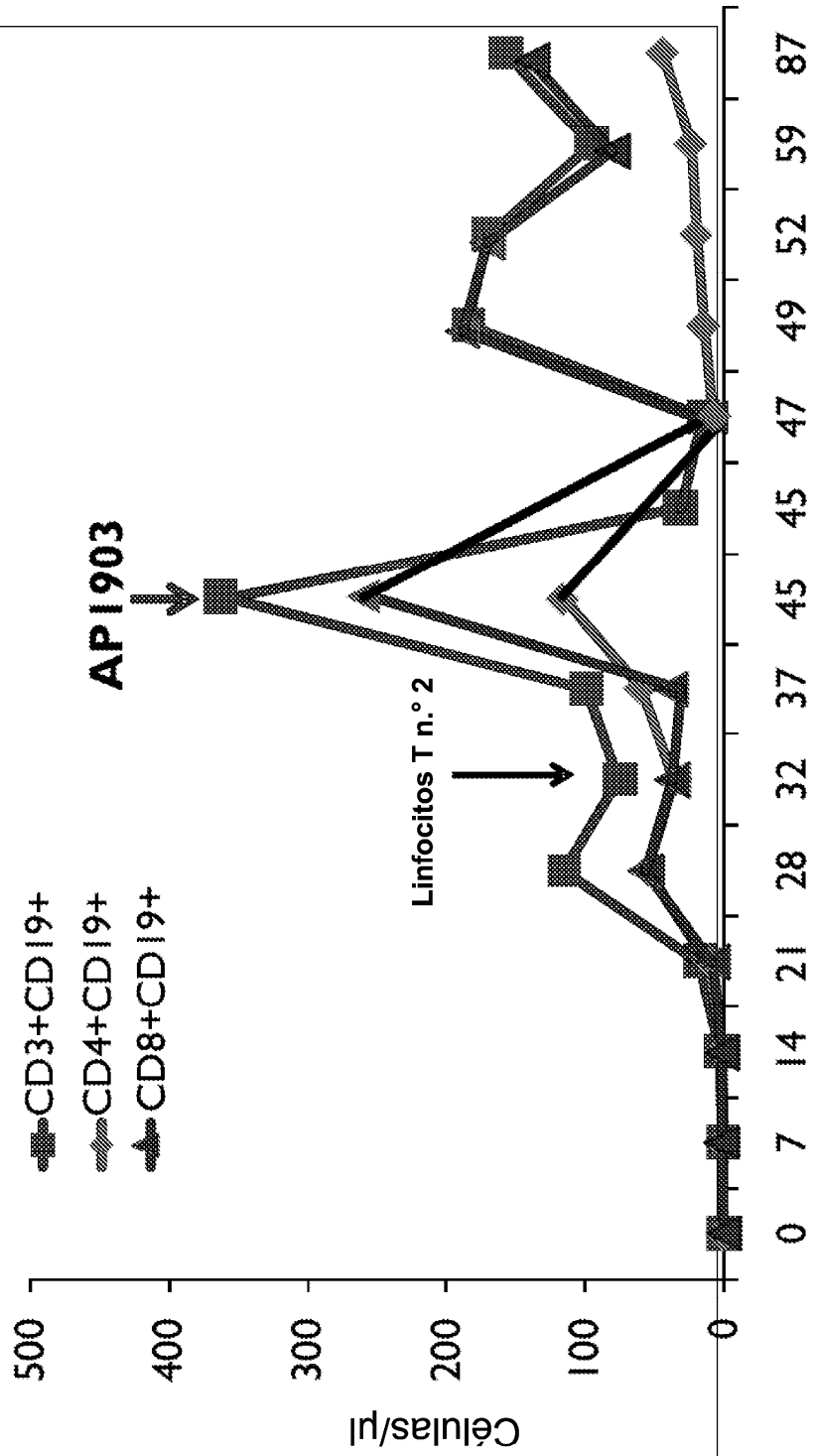


FIG. 38
Días después de los linfocitos T

Expansión de los linfocitos T alorreducidos iCasp9 y restauración del quimerismo del donante (Pt 2)

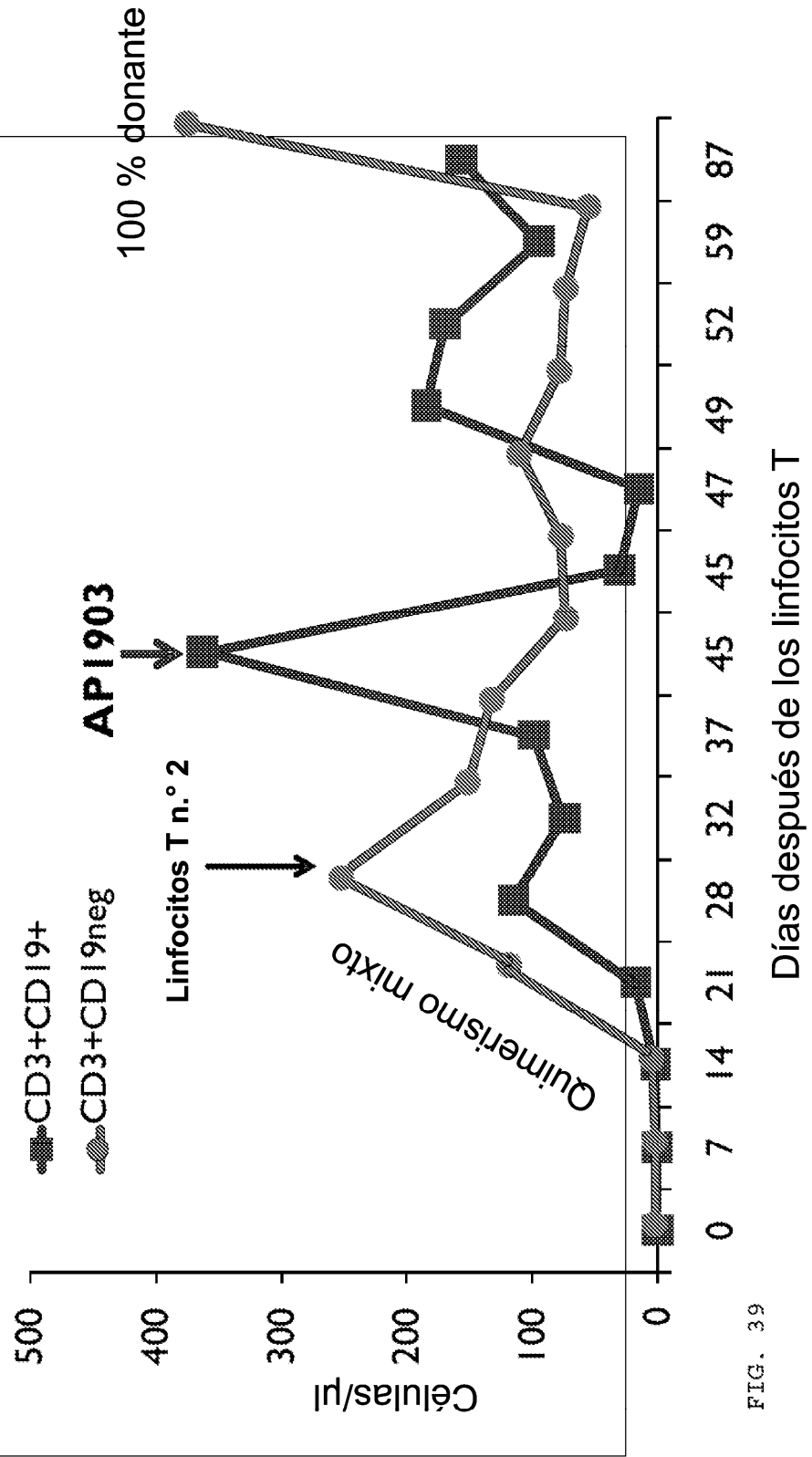


FIG. 39

Linfocitos T específicos de virus antes y después de la infusión de linfocitos T (Pt 2)

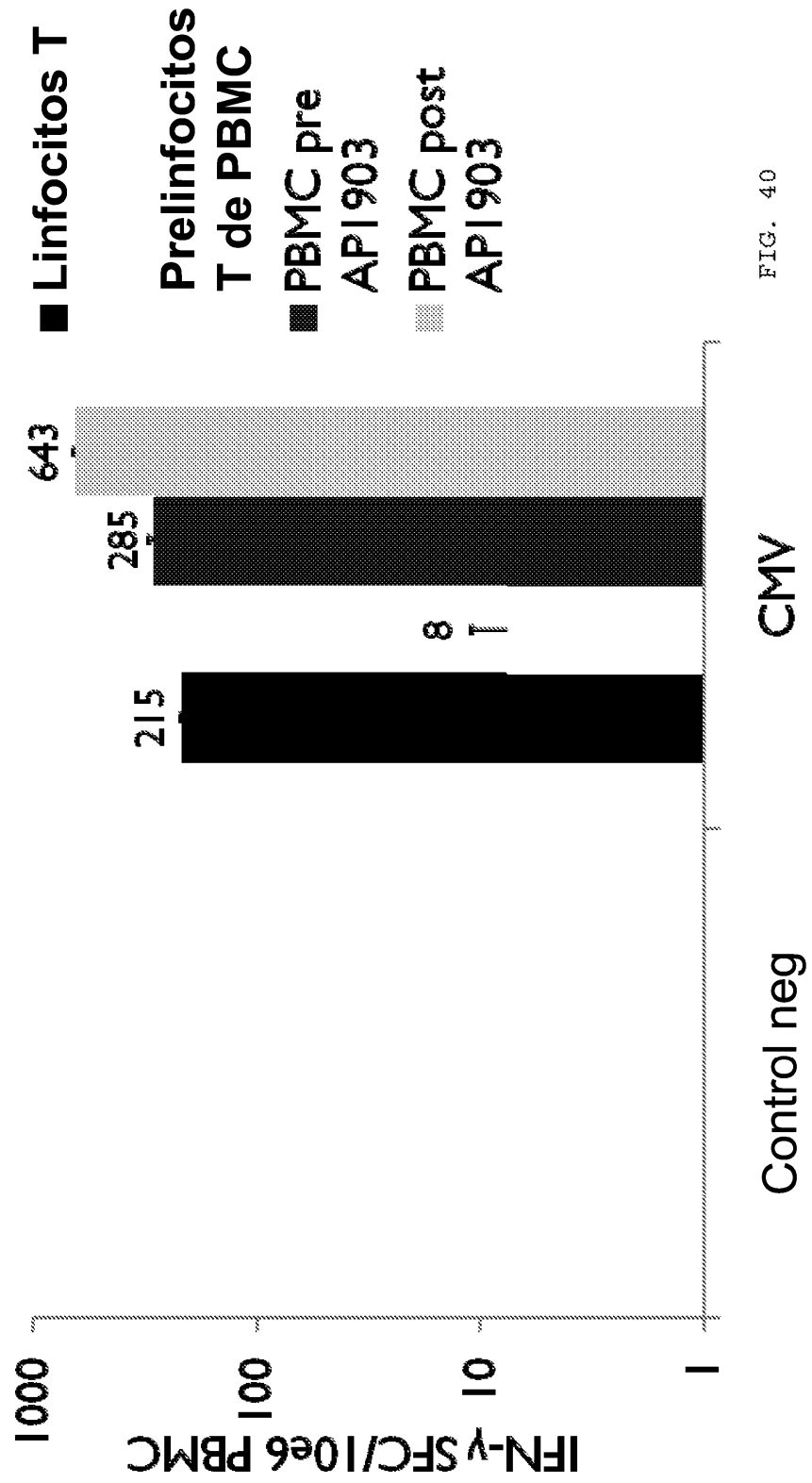


FIG. 40

Producción de IGM-γ intracelular mediante PBMC Pt en respuesta a *Aspergillus*

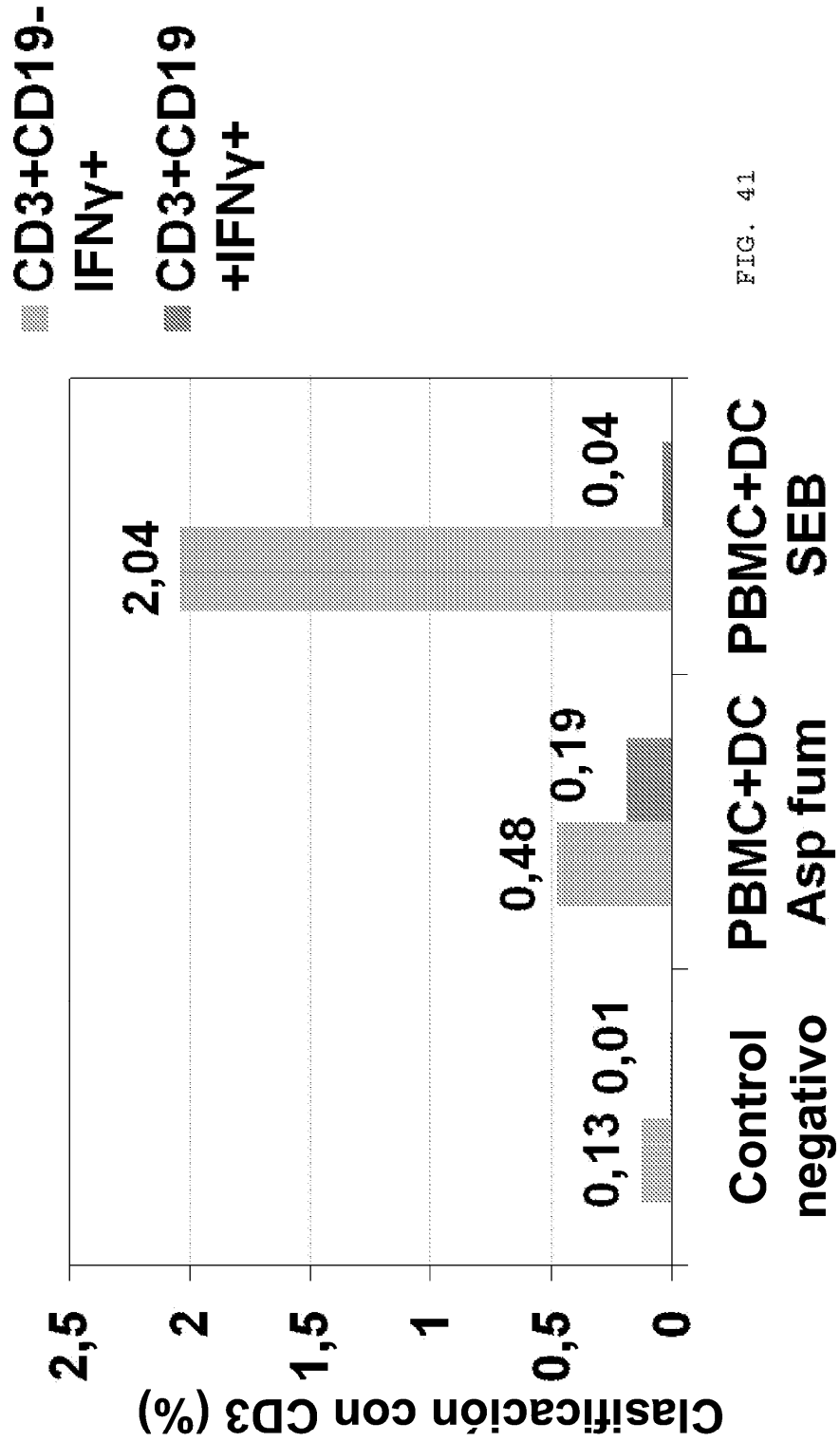


FIG. 41

Expansión de linfocitos T iCasp9 (Pt 3)

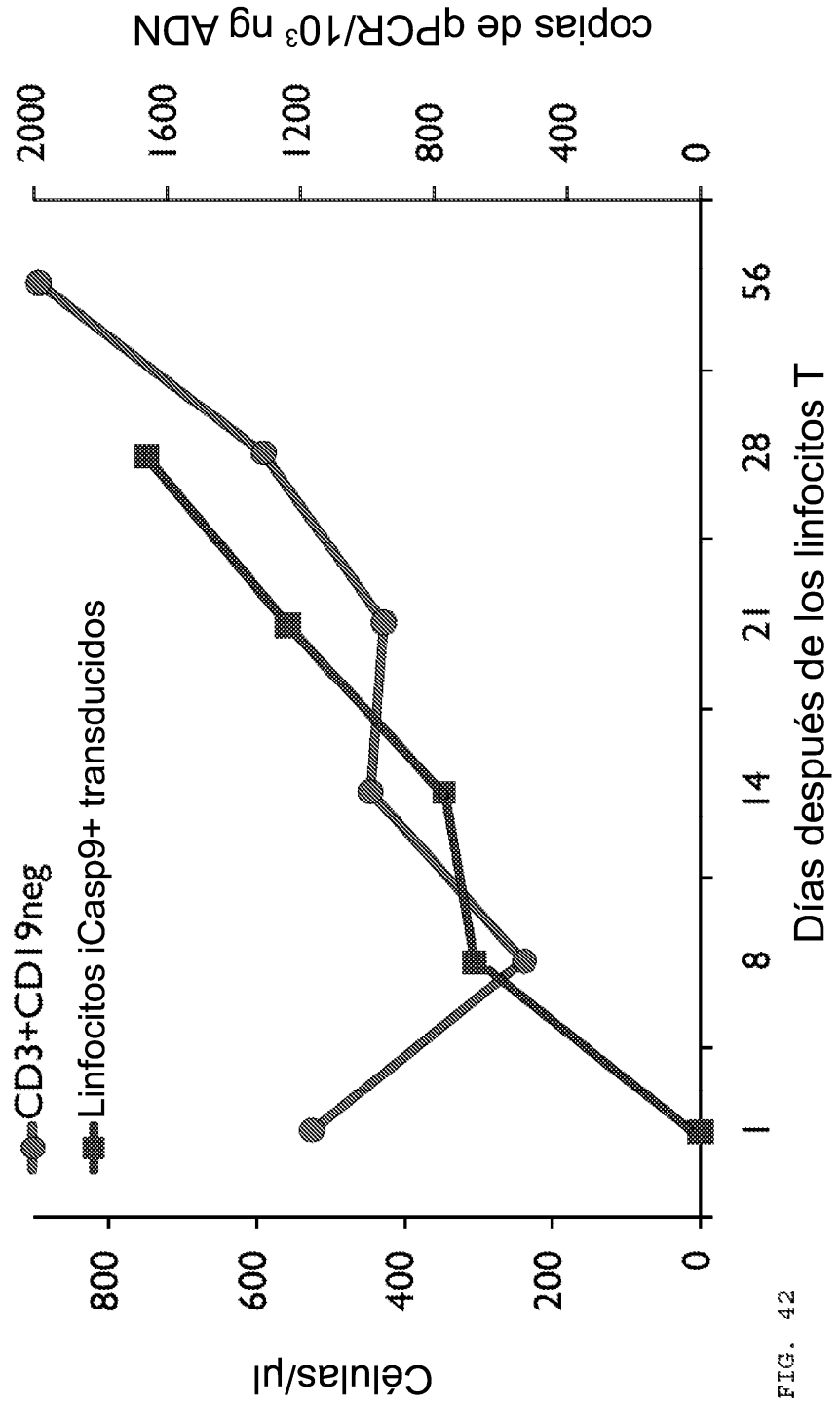


FIG. 42

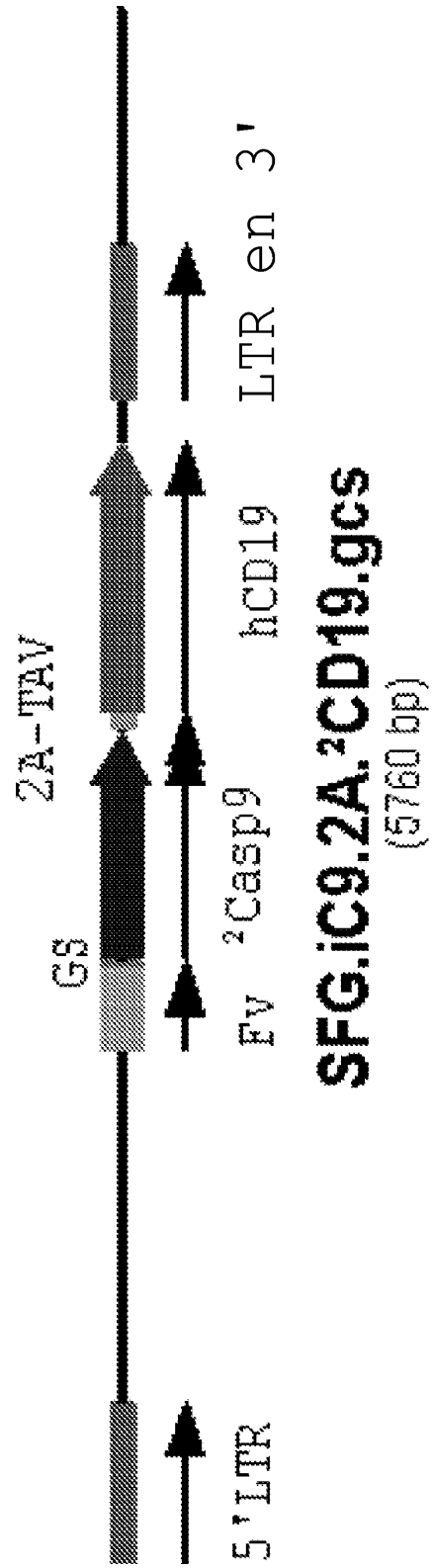


FIG. 43

Modelación de la actividad basal

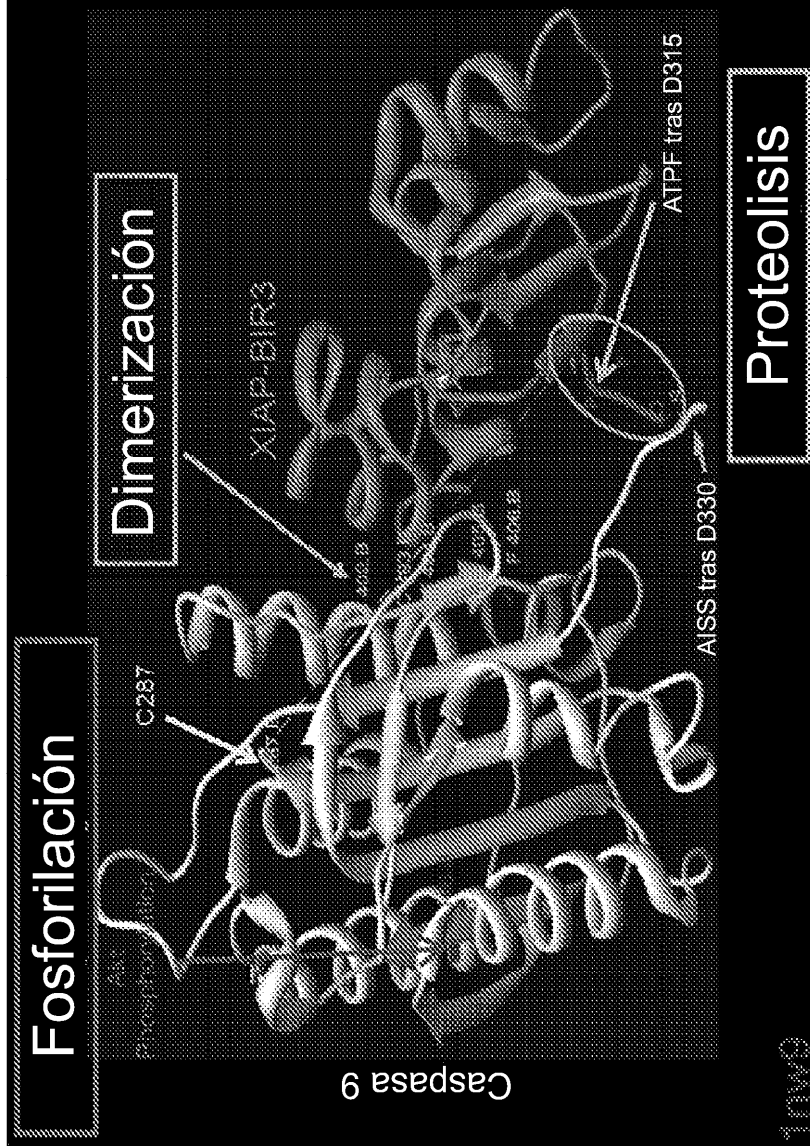


FIG 44

Ensayo de la fosfatasa alcalina secretada (SeAP)

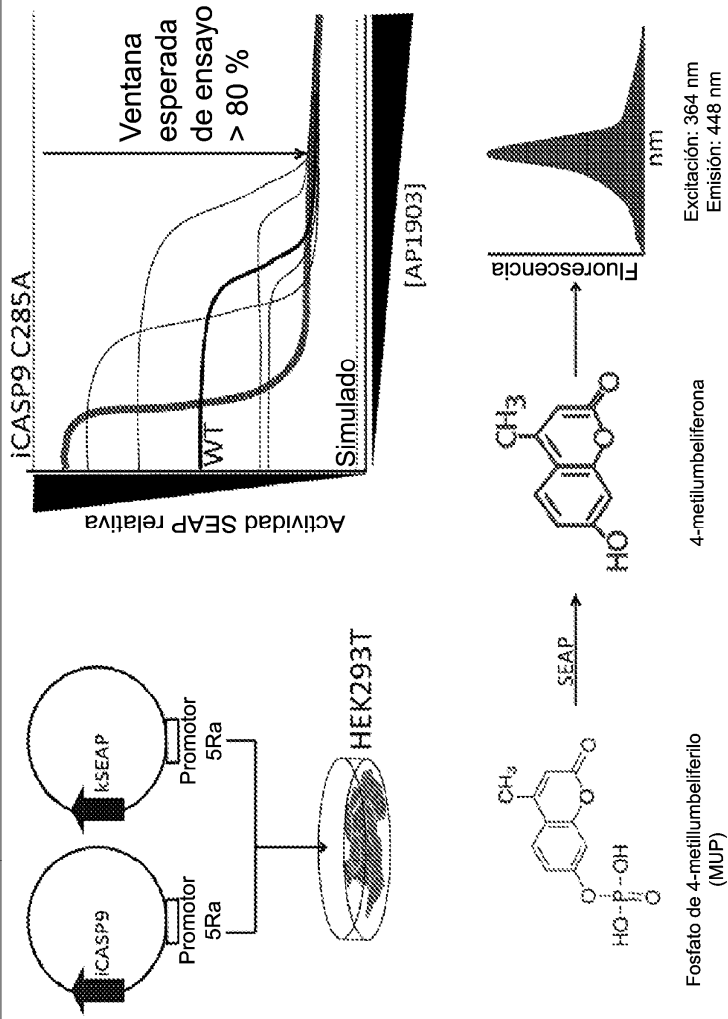
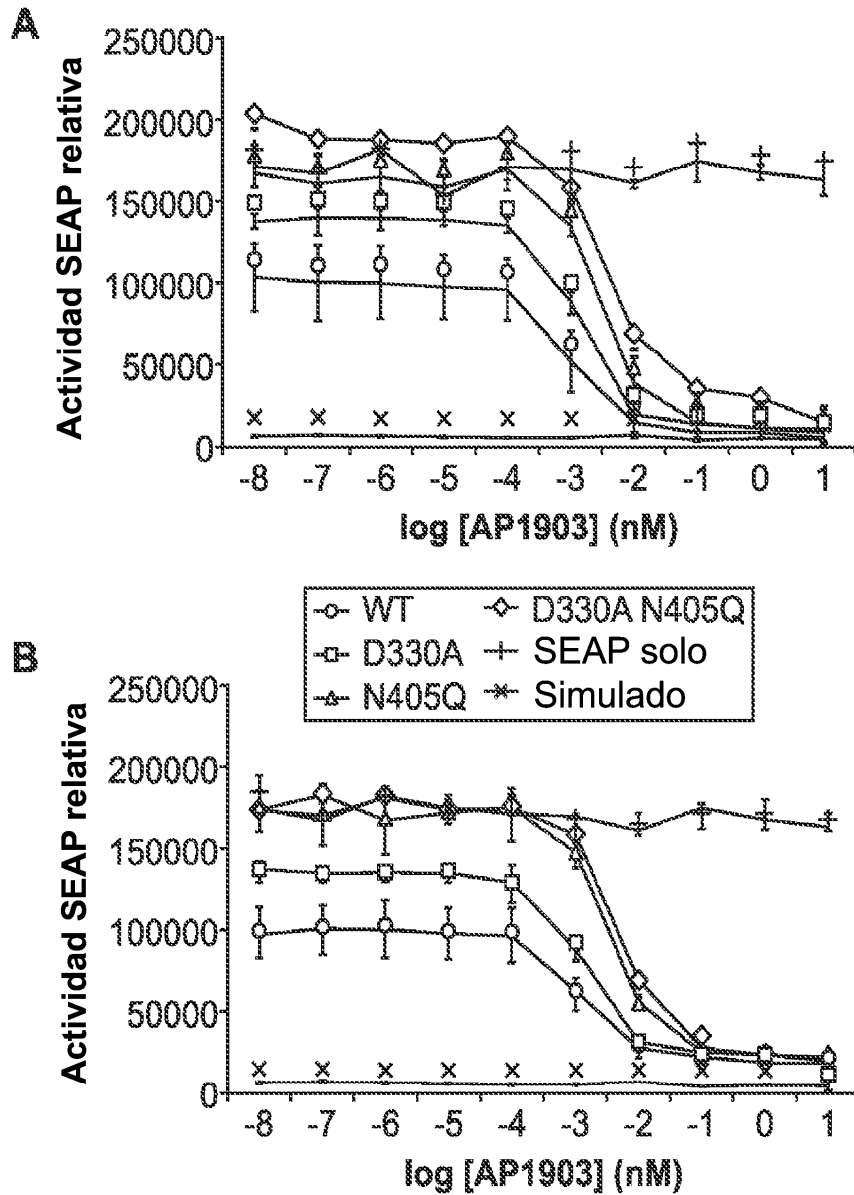


FIG 45



C

Candidatos CaspaCIDE-2.0	Cantidad de iCASP 9 (ug)*	Lectura superior	Lectura inferior	Intermedia	log IC50 (nM)	IC50 (nM)	valor p de la actividad basal
WT	1	114518	16454	65486	-3,1	0,0008	
D330A	1	148928	20740	84834	-2,6	0,0028	0,070
N405Q	1	179081	21570	100325	-2,4	0,0040	0,007
N405Q-D330A	1	205772	14756	110264	-2,3	0,0050	
WT	2	98889	19739	59314	-2,8	0,0016	
D330A	2	136863	22266	76564	-2,7	0,0020	0,0189
N405Q	2	175529	23308	99418	-2,3	0,0050	0,0006
N405Q-D330A	2	174366	23131	98748	-2,3	0,0056	0,0009

FIG. 46

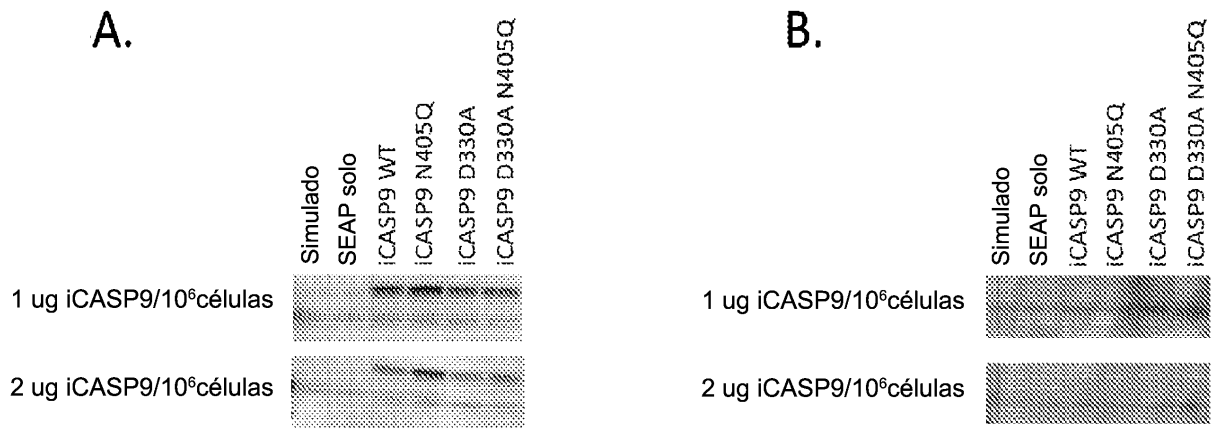


Fig. 47

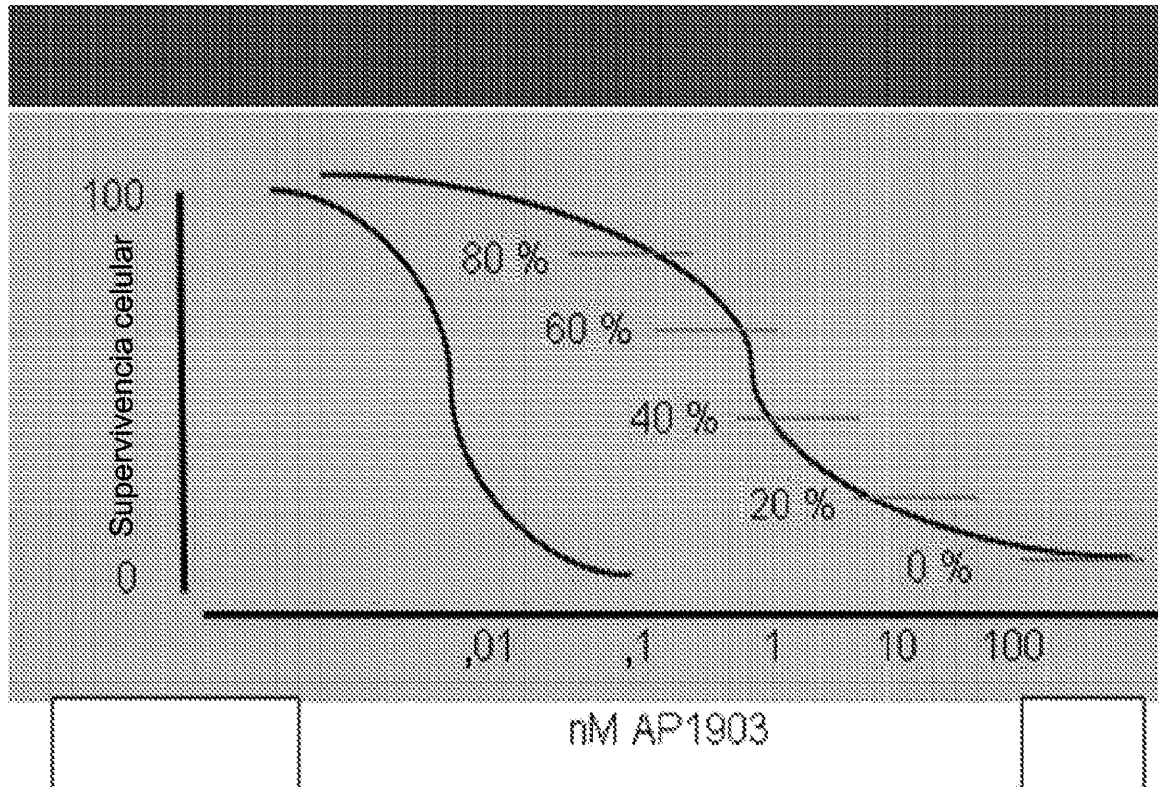
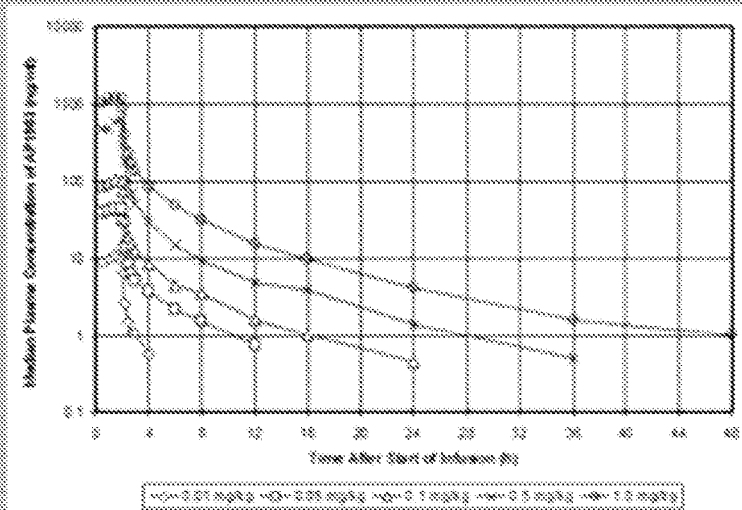


FIG. 48

Estudio de aumento de la dosis de AP1903 en voluntarios varones sanos

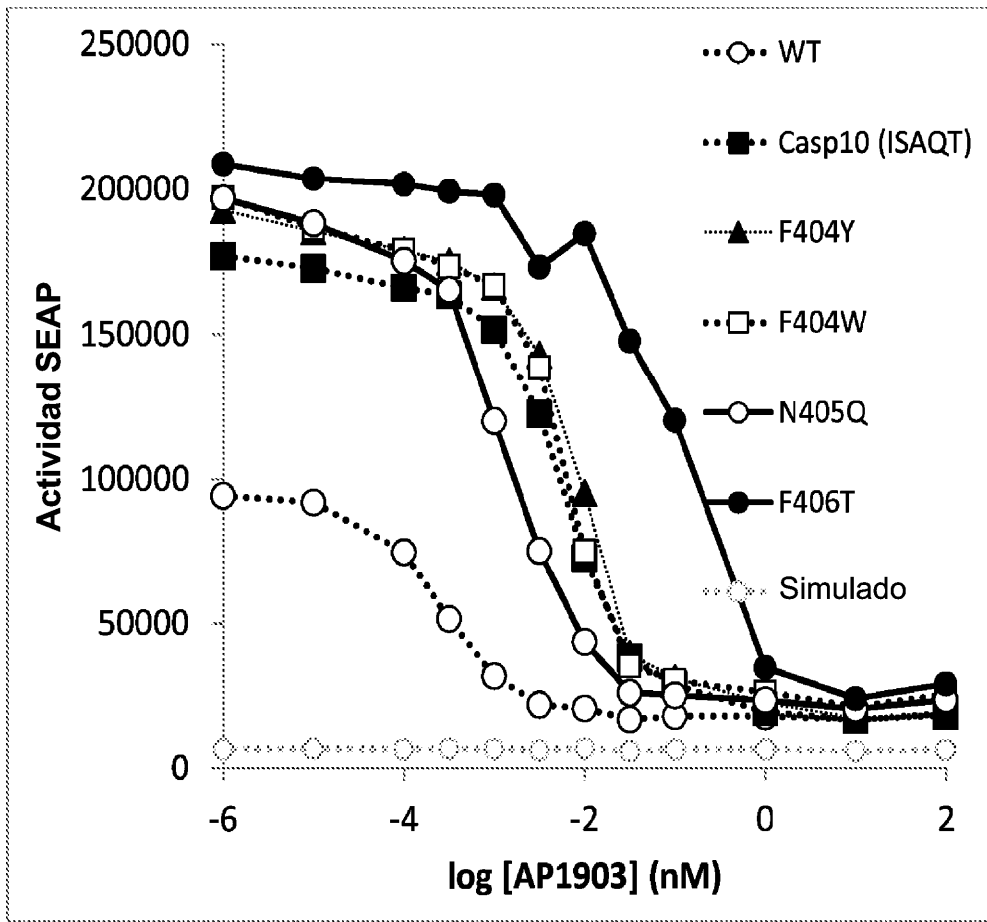


B

Parámetro	0,01 mg/kg	0,05 mg/kg	0,1 mg/kg	0,5 mg/kg	1,0 mg/kg
C_{max} (2 h)	11,2	46,8	107	626	1208
Conc media 30 min (ng/mL)	9	39	87	473	1062

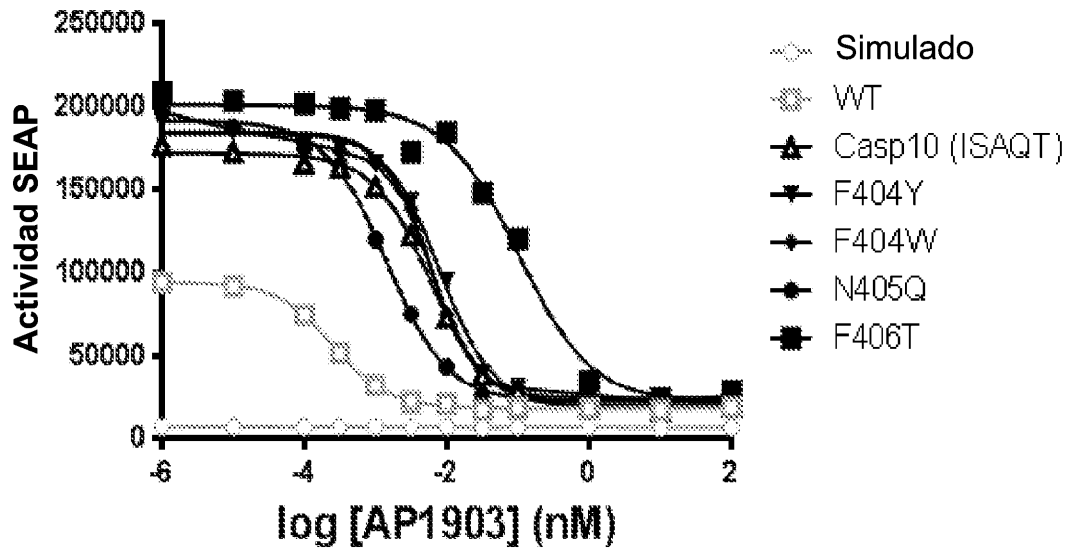
Rango dinámico en 30 minutos: 10-1000 nM

FIG 49



A

FIG. 50A



B

FIG 50B

CaspaCIDE	Actividad SEAP máxima	IC ₅₀ (pM)
WT	98154	0,3
Casp10 (ISAQT)	179081	5,8
F404Y	192420	8,0
F404W	197190	5,7
N405Q	207815	1,4
F406T	213509	101

C

Fig. 50C

CI₅₀ (nM) para AP1903 de varias variantes de CaspaCIDE

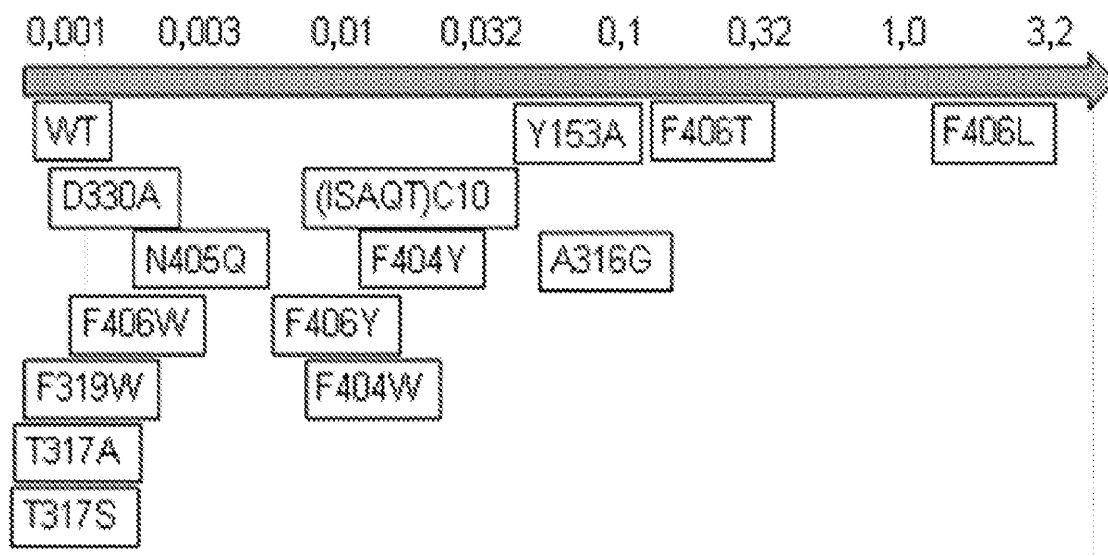


FIG. 51

Mutagénesis dirigida al emplazamiento del dominio de dimerización de Caspasa-9

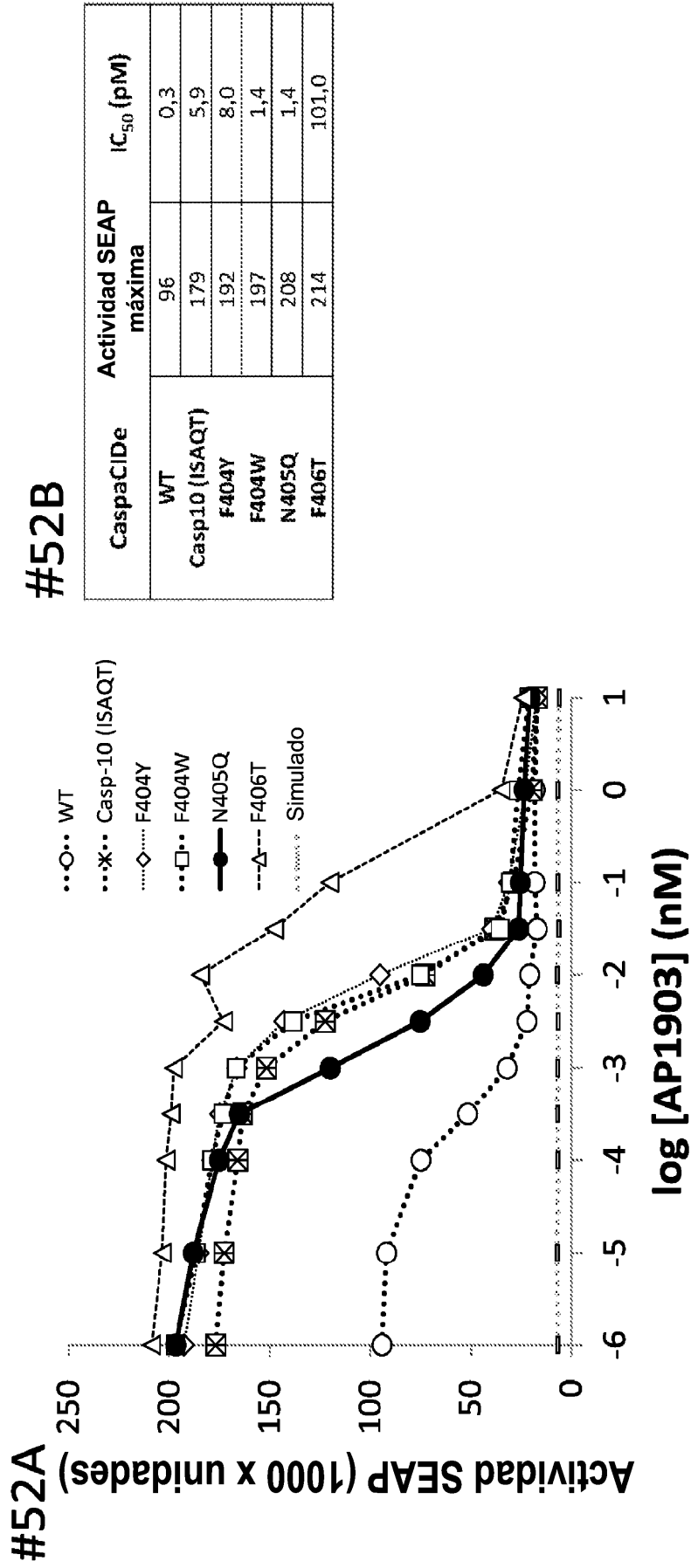


FIG 52

N405Q tiene una señalización basal significativamente inferior que la natural

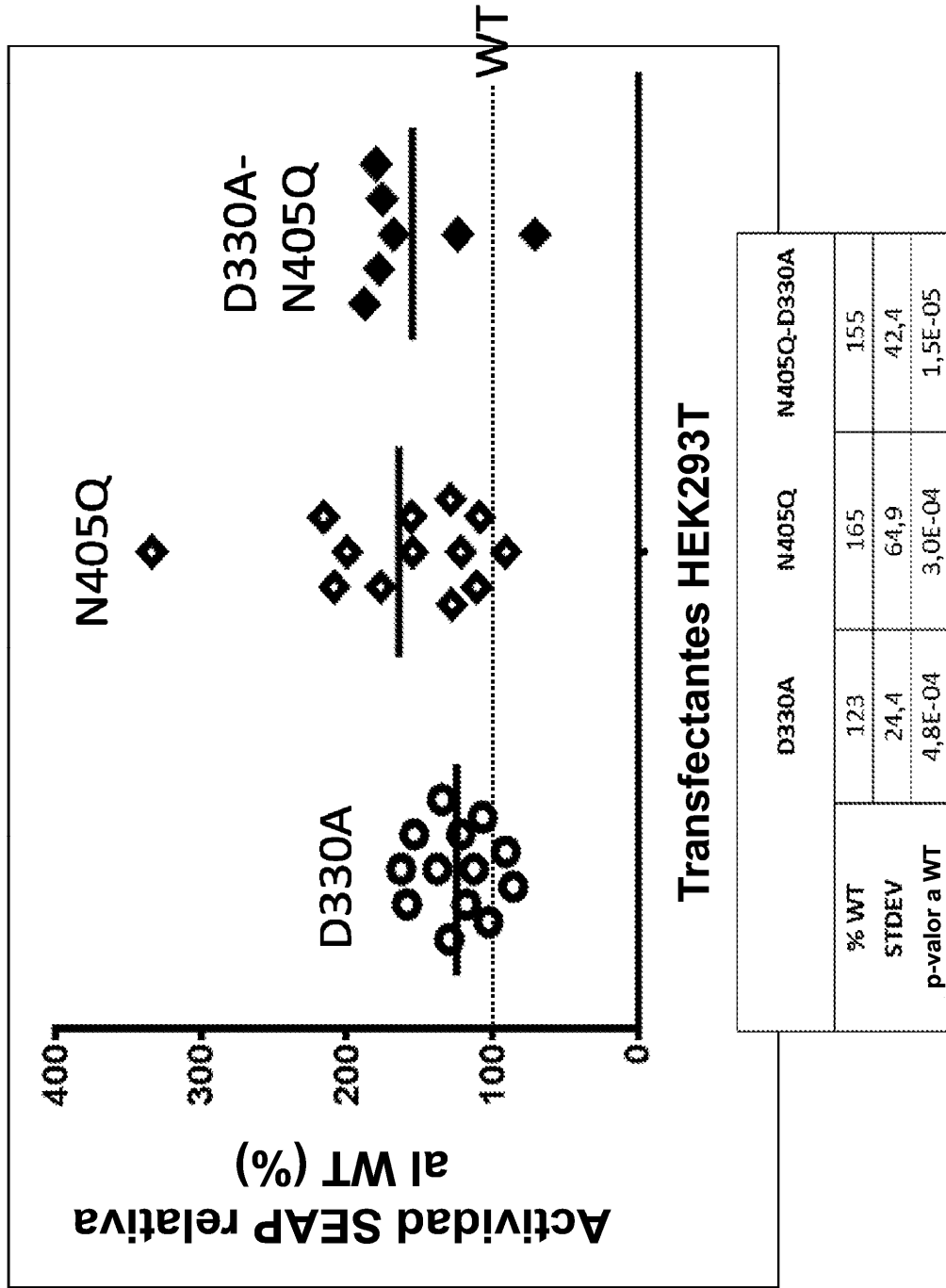
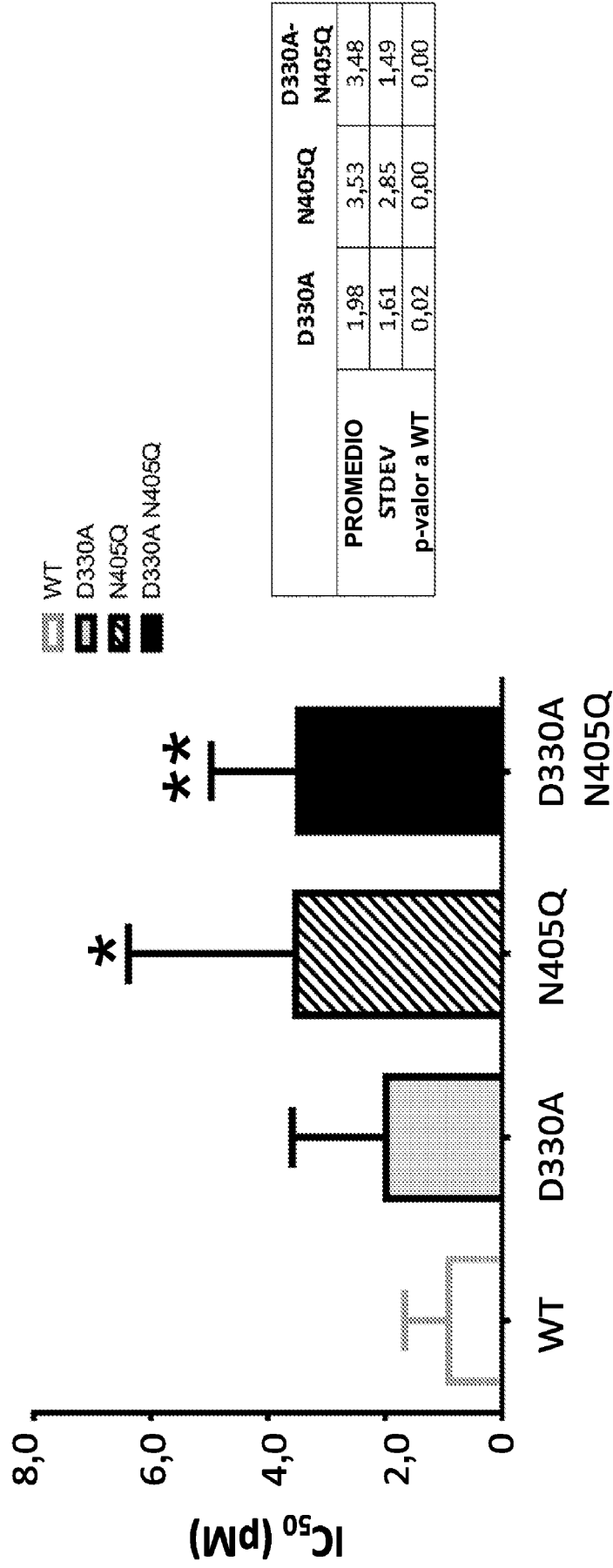


FIG 53A

N405Q 3-4-veces mayor IC_{50} para AP1903 que para el tipo natural



* $p < 0,05$
 ** $p < 0,005$

5 transfecciones independientes, 1-2 μg

FIG 53B

iCasp9-T317A/S disminuye la actividad basal sin gran desplazamiento en CI_{50}

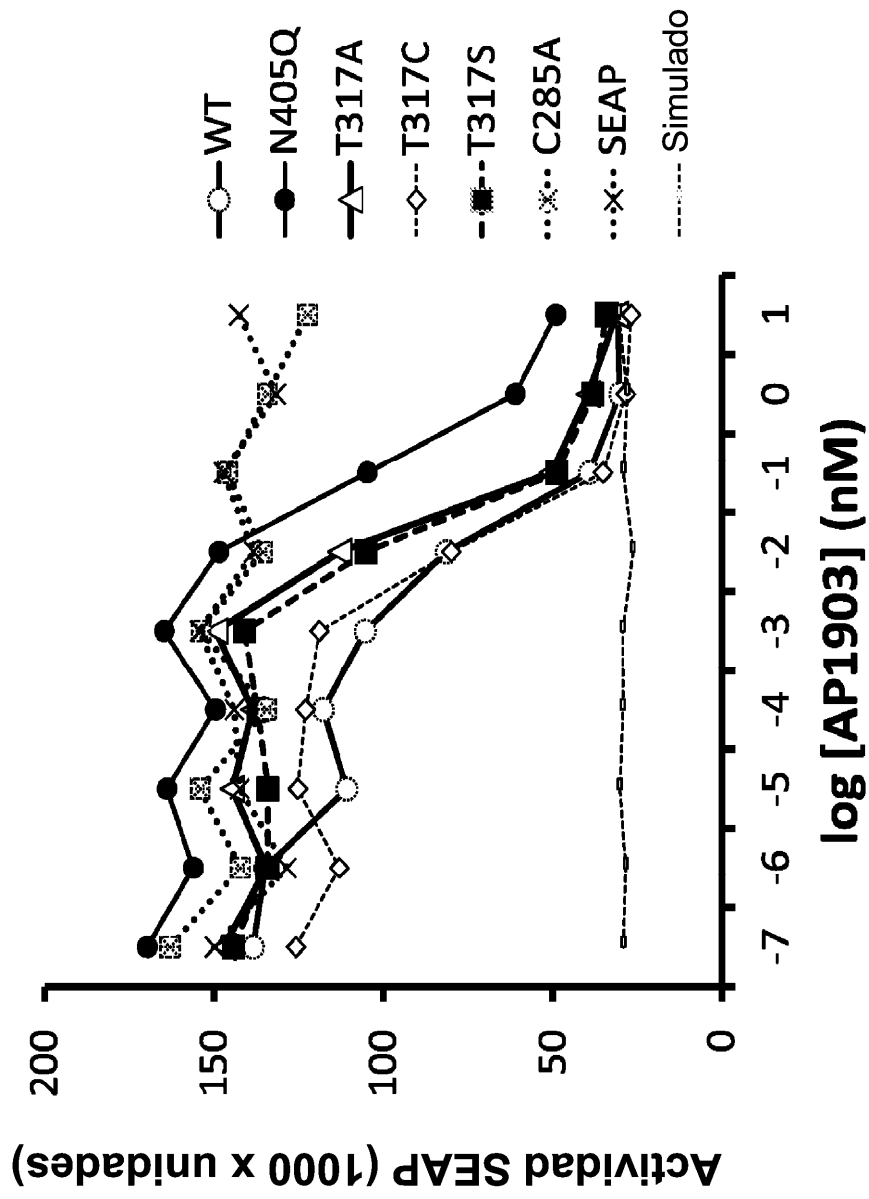
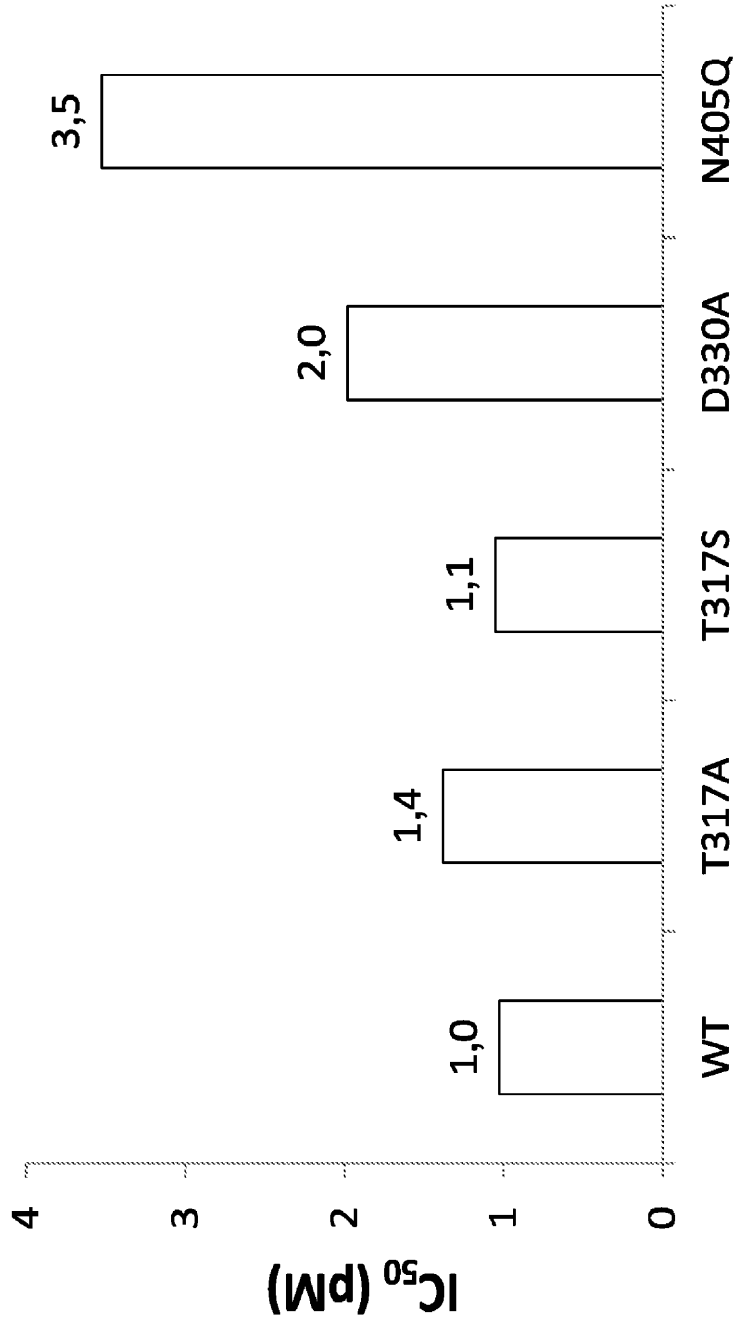


FIG 54

T317A/S disminuye la actividad basal sin gran desplazamiento en IC_{50}



CONFIDENCIAL

FIG 55

Los mutantes Caspase9-D330 (A, E y S) mostraron disminuir estadísticamente la actividad basal a Cl_{50} similares

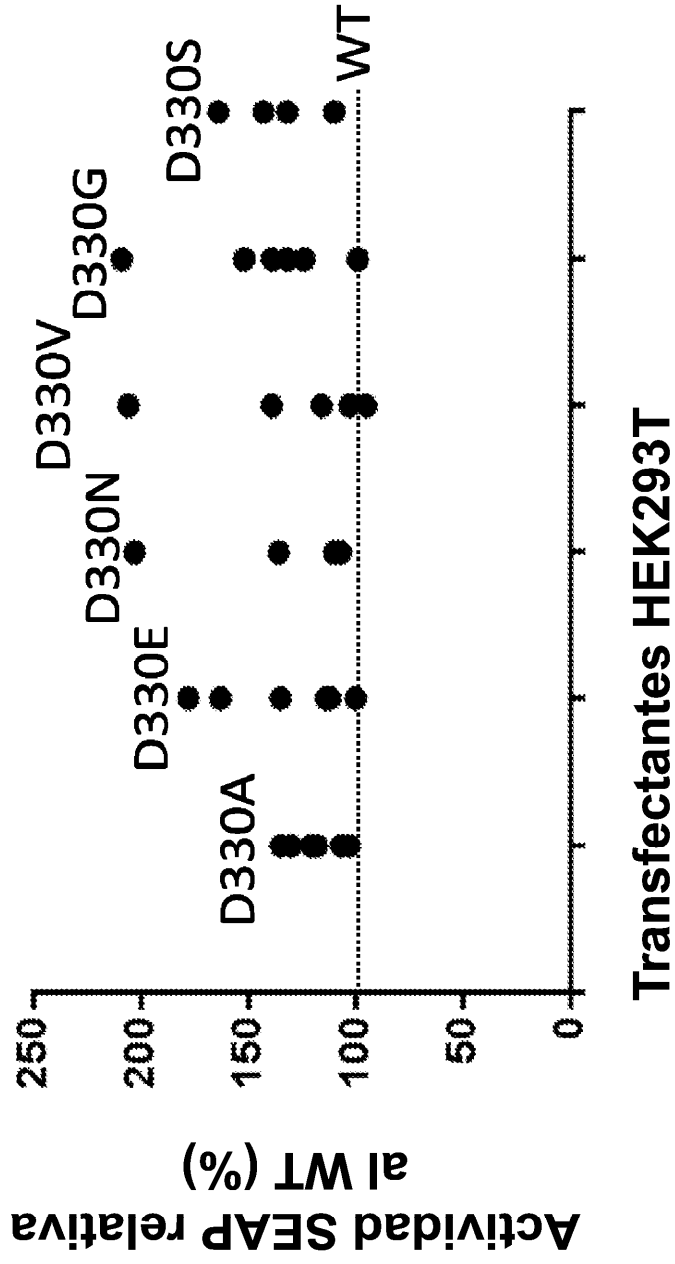
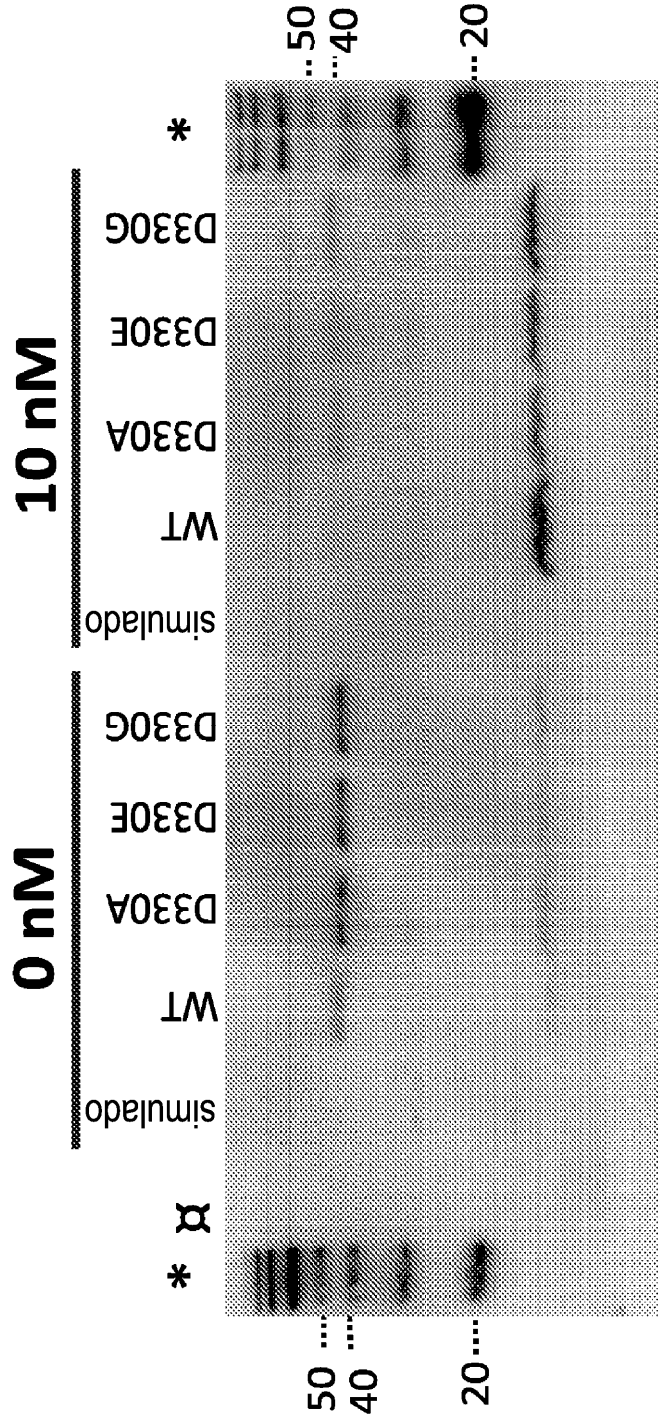


FIG 56

D330A, D330E y D330G muestran menor autoproteolisis, consistente con una menor actividad basal



* = 2 ul de escaleras de proteína SuperSignal MW (Thermo-Fisher Scientific)

α = 5 ul de patrones de doble color Precision Plus Protein (Bio-Rad)

FIG 57

Células PG13 transducidas (5X) con candidatas iCasp9-2.0

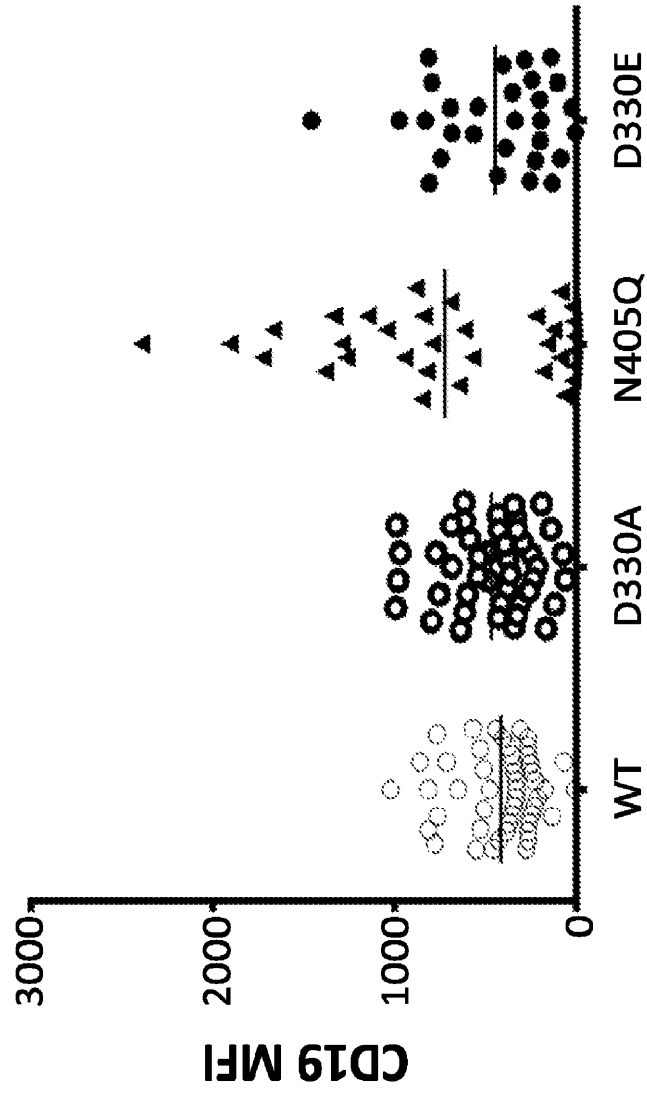


FIG 58

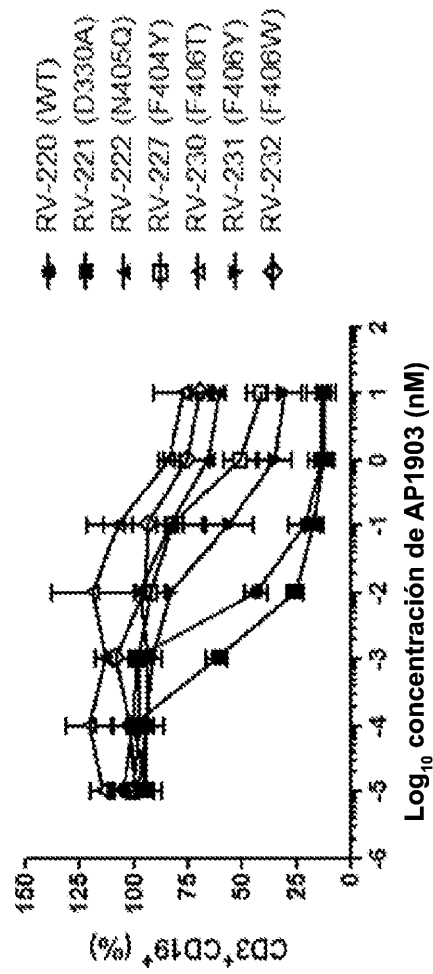


FIG 59

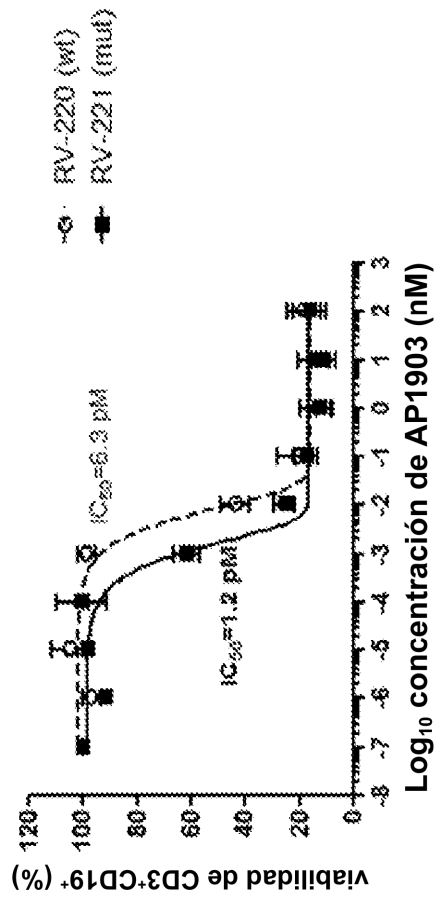


FIG 60

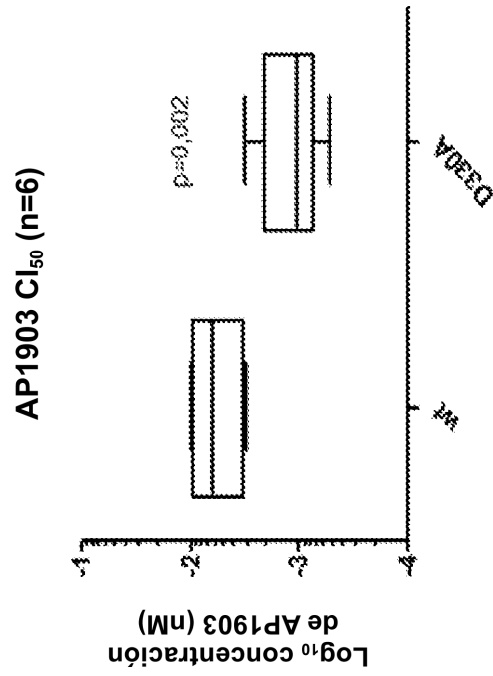


FIG 61

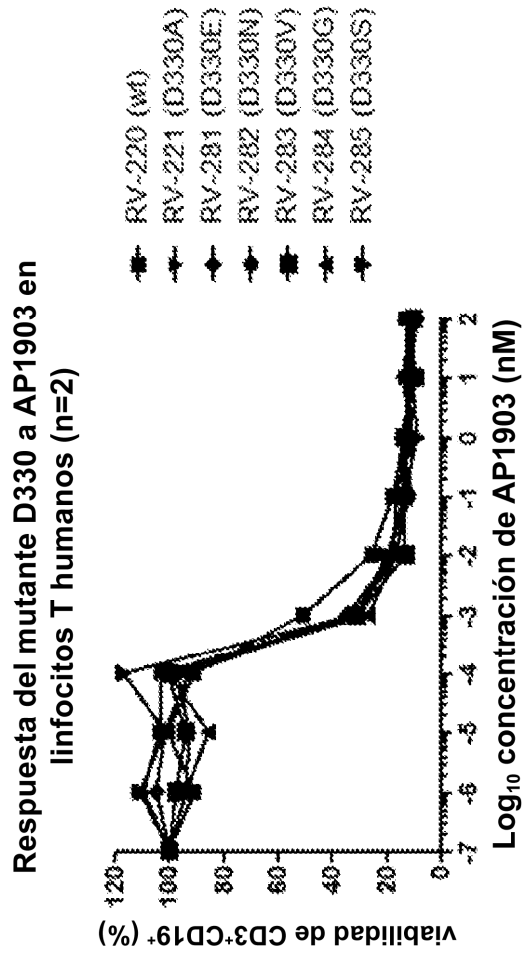


FIG 62

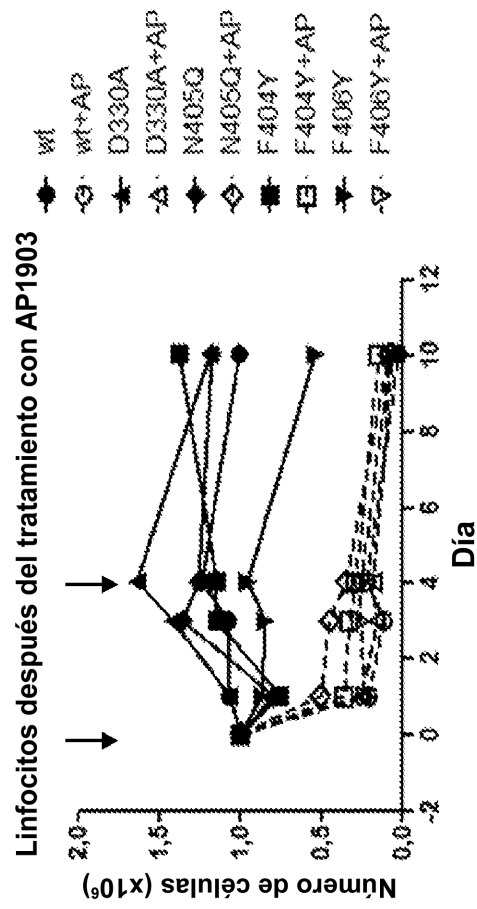


FIG 63

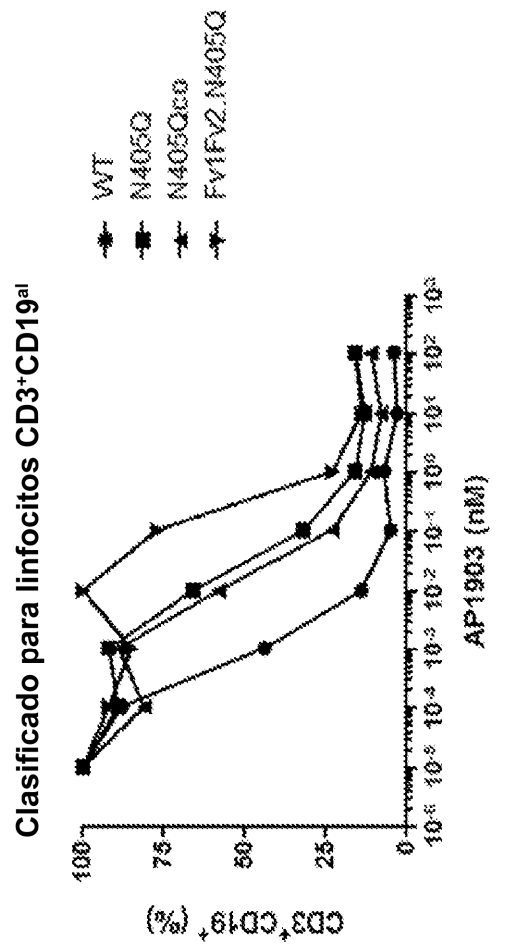


FIG 64

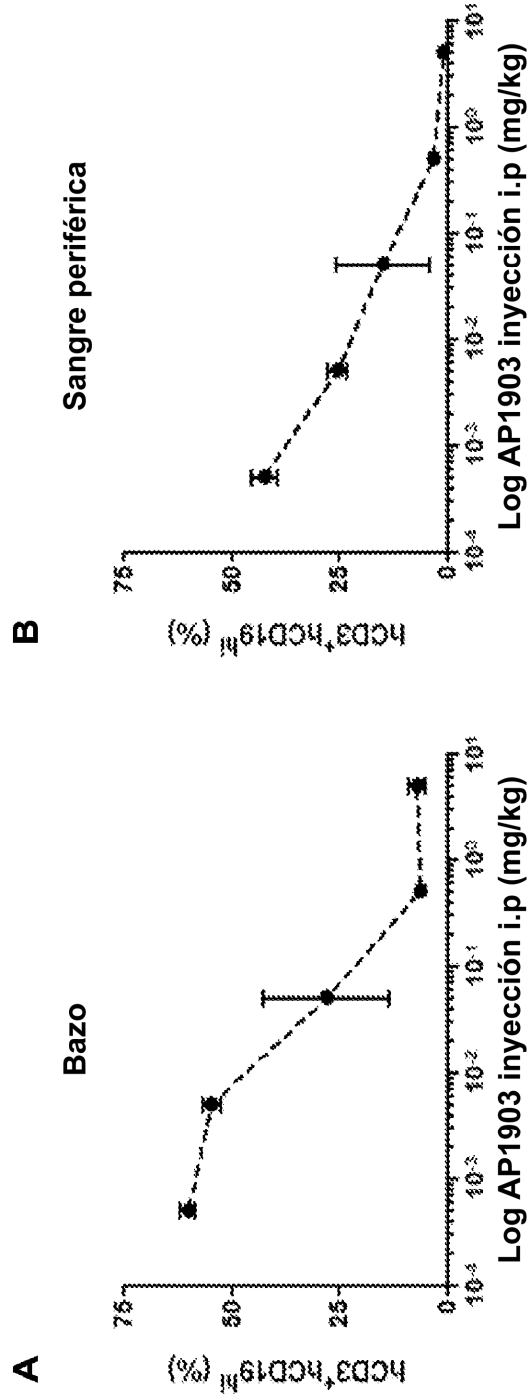


FIG 65

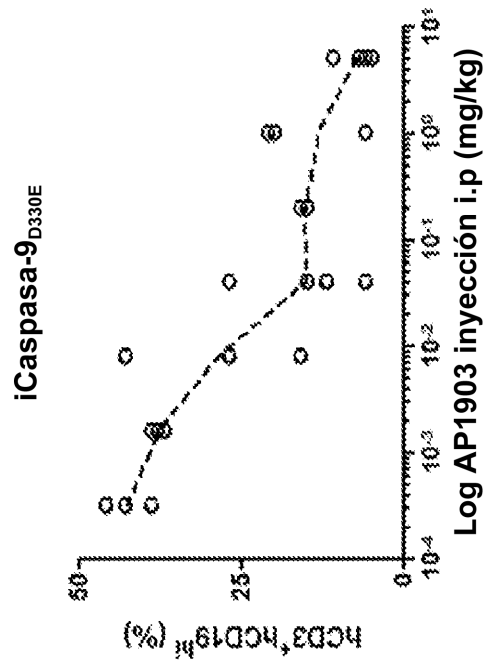


FIG 66