

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 867 224**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.04.2015 PCT/US2015/024895**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.10.2015 WO15157399**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2015 E 15776745 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.02.2021 EP 3129405**

54 Título: **Etiquetas genéticas transgénicas y métodos de uso**

30 Prioridad:

10.04.2014 US 201461977751 P

30.04.2014 US 201461986479 P

02.10.2014 US 201462058973 P

05.12.2014 US 201462088363 P

09.12.2014 US 201462089730 P

11.12.2014 US 201462090845 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.10.2021

73 Titular/es:

**SEATTLE CHILDREN'S HOSPITAL (DBA
SEATTLE CHILDREN'S RESEARCH INSTITUTE)**
(100.0%)

**1900 Ninth Avenue
Seattle WA 98101, US**

72 Inventor/es:

**JENSEN, MICHAEL C. y
JOHNSON, ADAM**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 867 224 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

Etiquetas genéticas transgénicas y métodos de uso

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a células que expresan polipéptidos y su uso para tratamiento del cáncer, al ácido nucleico que codifica dichos polipéptidos, y a los polipéptidos aislados de los mismos. Además, la presente invención se refiere a las composiciones y métodos útiles para detectar la expresión transgénica en células.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La expresión de transgenes en células se está convirtiendo en un enfoque terapéutico importante para una diversidad de afecciones. Por ejemplo, en inmunoterapia adoptiva, los linfocitos T humanos se manipulan mediante transferencia génica para expresar receptores de antígenos quiméricos (CAR) específicos para moléculas de superficie expresadas en células tumorales. Los receptores quiméricos son receptores sintéticos que incluyen un dominio de unión a ligando extracelular, lo más comúnmente un fragmento variable de cadena única de un anticuerpo monoclonal (scFv) unido a componentes de señalización intracelular, lo más comúnmente CD3 ζ solo o combinado con uno o más dominios coestimuladores. Otros ejemplos de afecciones tratadas con células modificadas por transgén incluyen talasemia, hemofilia, infarto de miocardio e inmunodeficiencia combinada severa. Sin embargo, sigue existiendo un problema importante con la obtención de expresión estable de expresión transgénica a niveles comparables a los de los genes endógenos. Existe la necesidad de identificar composiciones y métodos para seleccionar y/o detectar células que expresen transgenes a niveles elevados.

La técnica anterior ha desvelado células modificadas con transgén y polipéptidos expresados por tales células. Las bases de datos UniProt y Geneseq desvelan un fragmento del polipéptido HER2 (ID: J3QRJ7) y una proteína variante de corte y empalme expresada en células de ovario (ID: ADY30515; WO2005/017102 A2), respectivamente. Además, el documento WO2010/141543 desvela un fragmento de proteína HER2. Sin embargo, dichos fragmentos incluyen dominios del polipéptido HER2, que podría parecer que delimitan su unión a anticuerpos monoclonales usados para el tratamiento de cánceres, tales como Herceptin.

J. T. Garrett *et al.*, J. Immunol., 2007, 178, págs. 7120-7131, desvela polipéptidos que comprenden el dominio IV de HER2, que cubre el epítipo para Herceptin (Trastuzumab). Los polipéptidos están estimulados por el hecho de que no están unidos a un dominio transmembrana o un dominio conector.

X. Wang *et al.*, Blood, 2011, 118, págs. 1255-1263, desvela un polipéptido EGFR que carece de dominios de unión extracelulares y es para uso como diana para un anticuerpo monoclonal anti-EGFR. Además, el polipéptido no tiene un conector que comprenda una secuencia de aminoácidos para mejorar la unión a anticuerpos monoclonales útiles para tratar cánceres.

40

SUMARIO DE LA INVENCION

El uso y la selección de productos homogéneos ha sido un factor limitante para el éxito clínico y la reproducibilidad de las estrategias de terapia génica. Como se proporciona en el presente documento, se diseñó una etiqueta genética candidata y una herramienta para manipulación celular. En algunas alternativas, una etiqueta genética comprende un epítipo basado en Her2 humano, denominado Her2t. En una alternativa específica, Her2t carece de todos los componentes intracelulares de Her2, pero contiene la región transmembrana de Her2, un epítipo conformacionalmente intacto reconocido por el anticuerpo monoclonal trastuzumab (Herceptin) y un péptido para facilitar la expresión en la superficie. En el plásmido de empaquetamiento lentiviral ePHIV7 se incorporaron tres variantes del constructo Her2t, una que contiene el Dominio IV de Her2 completo y dos epítipos conformacionales que se diseñaron basándose en la estructura tridimensional de Her2 en complejo con Herceptin (Garrett *et al.*, J. Immunology 178:7120 (2007); Cho *et al.*, 2003), y se caracterizaron en células CHO.

En algunos aspectos, la utilización de Her2t como etiqueta genética permite la selección y purificación *ex vivo* de poblaciones homogéneas de agentes terapéuticos celulares que expresan un transgén de interés. Además, Her2t puede usarse para rastrear agentes terapéuticos celulares *in vivo*; por ejemplo, Her2t puede usarse como diana para tinción con Herceptin de aspirados de sangre, médula ósea y líquido cefalorraquídeo para comprobar la persistencia de agentes terapéuticos celulares que expresan transgén para seguir la remisión del cáncer hasta la persistencia terapéutica en un paciente. Her2t extiende el alcance terapéutico de la terapia con CAR al permitir la purificación concertada de células que expresan múltiples transgenes cuando se usa con otra etiqueta genética tal como EGFRt.

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un polipéptido aislado, que comprende al menos un 95 % de identidad de secuencia con un dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene los aminoácidos 563 a 652 de SEQ ID NO: 23, en donde el polipéptido aislado está unido a un dominio transmembrana, que comprende los aminoácidos 653-675 de SEQ ID NO: 23, en donde el polipéptido aislado comprende además un dominio conector que comprende la secuencia presentada en SEQ ID NO: 45, en donde el polipéptido aislado se une específicamente a un anticuerpo

65

que se une a un epítipo en el Dominio W de Her2, y en donde el polipéptido aislado excluye al dominio I de Her2, aminoácidos 23-217 de SEQ ID NO: 23, dominio II, aminoácidos 218-341 de SEQ ID NO: 23, dominio III, aminoácidos 342-510 de SEQ ID NO: 23, y dominios intracelulares.

En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, la divulgación proporciona un polipéptido aislado que comprende al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % de identidad de secuencia con un polipéptido de un dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos de 511 a 652 o 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 unido a un dominio transmembrana, en donde el polipéptido aislado se une específicamente a un anticuerpo que se une a un epítipo en el Dominio IV de Her2, y en donde el polipéptido aislado excluye al HER2 maduro de longitud completa. En el presente documento se incluyen ácidos nucleicos que codifican el polipéptido aislado.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido aislado como se describe en el presente documento.

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a una célula hospedadora aislada que expresa el polipéptido aislado como se describe en el presente documento o el ácido nucleico aislado como se describe en el presente documento, en donde la célula hospedadora se selecciona entre el grupo que consiste en linfocitos T CD8, linfocitos T CD4, linfocitos T CD4 sin activación previa, linfocitos T CD8 sin activación previa, linfocitos CD8 de memoria central, linfocitos CD4 de memoria central, y combinaciones de los mismos.

En otras alternativas, se proporcionan células hospedadoras que comprenden el ácido nucleico que codifica un polipéptido aislado que comprende al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % de identidad de secuencia con un polipéptido de un dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 511 a 562 o 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 unido a un dominio transmembrana, y en donde el polipéptido aislado se une específicamente a un anticuerpo que se une a un epítipo en el Dominio IV de Her2. Las células hospedadoras pueden seleccionarse entre el grupo que consiste en linfocitos T CD8, linfocitos T CD4, linfocitos T CD4 sin activación previa, linfocitos T CD8 sin activación previa, linfocitos CD8 de memoria central, linfocitos CD4 de memoria central, y combinaciones de los mismos. Las células hospedadoras pueden comprender además un segundo ácido nucleico que codifica un segundo receptor antigénico quimérico unido a una segunda etiqueta genética. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, el segundo ácido nucleico puede introducirse en las mismas células hospedadoras que un ácido nucleico que codifica un polipéptido aislado que comprende al menos un 95 % de identidad de secuencia con un polipéptido de un dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 511 a 562 o 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 unido a un dominio transmembrana, en donde el polipéptido aislado se une específicamente a un anticuerpo que se une a un epítipo en el Dominio IV de Her2. En otras alternativas de acuerdo con la divulgación, el segundo ácido nucleico se introduce en una segunda población de células hospedadoras y al menos las dos poblaciones de células hospedadoras se combinan en una sola combinación. En algunas alternativas, los linfocitos T comprenden linfocitos T precursores. En algunas alternativas, los linfocitos T precursores son células madre hematopoyéticas.

De acuerdo con la divulgación, otro aspecto de la divulgación proporciona métodos para fabricar composiciones que comprenden células hospedadoras como se describe en el presente documento. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, un método comprende introducir un ácido nucleico aislado, tal como un ácido nucleico que codifica un polipéptido aislado que comprende al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % de identidad de secuencia con un polipéptido de un dominio extracelular (ECD) de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 511 a 652 o 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 unido a un dominio transmembrana, en donde el polipéptido aislado se une específicamente a un anticuerpo que se une a un epítipo en el Dominio IV de Her2, en una célula hospedadora; y cultivar las células hospedadoras en un medio que comprende al menos un factor de crecimiento. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, un método comprende además seleccionar las células hospedadoras para expresión de ECD antes o después o tanto antes como después de la etapa de cultivo. En otras alternativas de acuerdo con la divulgación, un método de fabricación comprende además introducir un segundo ácido nucleico que codifica un segundo receptor antigénico quimérico y una segunda etiqueta genética en la célula hospedadora. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, el método comprende además seleccionar las células hospedadoras para expresión de la segunda etiqueta genética antes o después o tanto antes como después de la etapa de cultivo.

En otras alternativas de acuerdo con la divulgación, se proporciona un método en donde el método comprende introducir un primer ácido nucleico aislado, tal como un ácido nucleico que codifica un polipéptido aislado que comprende al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % de identidad de secuencia con un polipéptido de un dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 511 a 652 o 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 unido a un dominio transmembrana, en donde el polipéptido aislado se une específicamente a un anticuerpo que se une a un epítipo en el Dominio IV de Her2, en una primera célula hospedadora; seleccionar primeras células hospedadoras que expresan ECD, introducir un segundo ácido nucleico que codifica un segundo receptor antigénico quimérico y una segunda etiqueta genética en una segunda célula hospedadora, seleccionar segundas células hospedadoras para expresión de la segunda etiqueta genética, y opcionalmente, cultivar la primera y segunda células hospedadoras en un medio que comprende al menos un factor de crecimiento. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, una composición comprende una primera y segunda población de células hospedadoras.

Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a una célula hospedadora aislada como se describe en el presente documento, para uso para tratar un cáncer que tiene un antígeno tumoral reconocido por el receptor o receptores antigénicos quiméricos en las células.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a métodos y usos de las composiciones para tratar cáncer, rastrear las células de la composición *in vivo*, y destruir las células de la composición *in vivo*. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, se proporciona un método en donde el método comprende tratar a un paciente con cáncer y que expresa un antígeno tumoral, en donde el método comprende además administrar una cantidad eficaz de una composición de células hospedadoras que comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican un receptor antigénico quimérico unido a una etiqueta genética. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, las células hospedadoras de la composición comprenden un primer ácido nucleico que codifica un primer receptor antigénico quimérico unido a una primera etiqueta genética y un segundo ácido nucleico que codifica un segundo receptor antigénico quimérico unido a una segunda etiqueta genética. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, el método comprende además administrar un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a la etiqueta genética. En algunas alternativas, se administra un anticuerpo que se une a la primera etiqueta genética, se administra un anticuerpo que se une específicamente a la segunda etiqueta genética, o se administran ambos. En algunas alternativas, el anticuerpo se marca con una marca detectable, un agente citotóxico, o ambos.

En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, se proporciona un polipéptido aislado, en donde el polipéptido aislado comprende al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % de identidad de secuencia con un polipéptido de un dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 unido a un dominio transmembrana, en donde el polipéptido aislado se une específicamente a un anticuerpo que se une a un epítipo en el Dominio IV de Her2, y en donde el polipéptido aislado excluye al HER2 maduro de longitud completa. En algunas alternativas, el polipéptido HER2 comprende los aminoácidos ácido glutámico 580, ácido aspártico 582, ácido aspártico 592, fenilalanina 595, y glutamina 624 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el polipéptido HER2 comprende los aminoácidos 563-652 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el dominio transmembrana comprende los aminoácidos 653-675 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el polipéptido aislado comprende además un péptido líder que proporciona expresión en la superficie celular. En algunas alternativas, el péptido líder tiene la secuencia de SEQ ID NO: 17. En algunas alternativas, el anticuerpo es trastuzumab.

En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, se proporciona un polipéptido aislado, en donde el polipéptido aislado comprende al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % de identidad de secuencia con un polipéptido de un dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 unido a un dominio transmembrana, en donde el polipéptido aislado se une específicamente a un anticuerpo que se une a un epítipo en el Dominio IV de Her2, y en donde el polipéptido aislado excluye al HER maduro de longitud completa, y en donde el dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 está unido al dominio transmembrana mediante una secuencia que comprende los aminoácidos GGGSGGGS (SEQ ID NO: 45). En algunas alternativas, el polipéptido HER2 comprende los aminoácidos ácido glutámico 580, ácido aspártico 582, ácido aspártico 592, fenilalanina 595, y glutamina 624 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el polipéptido HER2 comprende los aminoácidos 563-652 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el dominio transmembrana comprende los aminoácidos 653-675 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el polipéptido aislado comprende además un péptido líder que proporciona expresión en la superficie celular. En algunas alternativas, el péptido líder comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 17. En algunas alternativas, el anticuerpo es trastuzumab.

En algunas alternativas, se proporciona un ácido nucleico aislado en donde el ácido nucleico aislado codifica un polipéptido. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, el polipéptido aislado comprende al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % de identidad de secuencia con un polipéptido de un dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 unido a un dominio transmembrana, en donde el polipéptido aislado se une específicamente a un anticuerpo que se une a un epítipo en el Dominio IV de Her2, y en donde el polipéptido aislado excluye al HER2 maduro de longitud completa. En algunas alternativas, el polipéptido HER2 comprende los aminoácidos ácido glutámico 580, ácido aspártico 582, ácido aspártico 592, fenilalanina 595, y glutamina 624 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el polipéptido HER2 comprende los aminoácidos 563-652 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el dominio transmembrana comprende los aminoácidos 653-675 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el polipéptido aislado comprende además un péptido líder que proporciona expresión en la superficie celular. En algunas alternativas, el péptido líder tiene la secuencia de SEQ ID NO: 17. En algunas alternativas, el anticuerpo es trastuzumab. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, el polipéptido aislado comprende al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % de identidad de secuencia con un polipéptido de un dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 unido a un dominio transmembrana, en donde el polipéptido aislado se une específicamente a un anticuerpo que se une a un epítipo en el Dominio IV de Her2, y en donde el polipéptido aislado excluye al HER maduro de longitud completa, y en donde el dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 está unido al dominio transmembrana mediante una secuencia que comprende los aminoácidos GGGSGGGS (SEQ ID NO: 45). En algunas alternativas, el polipéptido HER2 comprende los aminoácidos ácido glutámico 580, ácido aspártico 582, ácido aspártico 592, fenilalanina 595, y

glutamina 624 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el polipéptido HER2 comprende los aminoácidos 563-652 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el dominio transmembrana comprende los aminoácidos 653-675 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el polipéptido aislado comprende además un péptido líder que proporciona expresión en la superficie celular. En algunas alternativas, el péptido líder comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 17. En algunas alternativas, el anticuerpo es trastuzumab. En algunas alternativas, el ácido nucleico aislado comprende además un promotor. En algunas alternativas, el ácido nucleico aislado comprende además un transgén. En algunas alternativas, el transgén comprende un polinucleótido que codifica un receptor antigénico quimérico. En algunas alternativas, el receptor antigénico quimérico comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio espaciador, un dominio transmembrana y al menos un dominio estimulador. En algunas alternativas, el polinucleótido que codifica el transgén está unido al ácido nucleico que codifica el polipéptido HER2 con un conector de autoescisión. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, el polipéptido HER2 comprende al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % de identidad de secuencia con un polipéptido de un dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 unido a un dominio transmembrana, en donde el polipéptido aislado se une específicamente a un anticuerpo que se une a un epítipo en el Dominio IV de Her2, y en donde el polipéptido aislado excluye al HER2 maduro de longitud completa. En algunas alternativas, el conector de autoescisión es un conector T2A que tiene la secuencia LEGGEGRGSLTTCG (SEQ ID NO: 26). En algunas alternativas, el receptor antigénico quimérico comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En algunas alternativas, el receptor antigénico quimérico comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 (CD20CAR).

En algunas alternativas, se proporciona una célula hospedadora en donde la célula hospedadora comprende un ácido nucleico aislado, en donde el ácido nucleico aislado codifica un polipéptido. En algunas alternativas, el polipéptido aislado comprende al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % de identidad de secuencia con un polipéptido de un dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 unido a un dominio transmembrana, en donde el polipéptido aislado se une específicamente a un anticuerpo que se une a un epítipo en el Dominio IV de Her2, y en donde el polipéptido aislado excluye al HER2 maduro de longitud completa. En algunas alternativas, el polipéptido HER2 comprende los aminoácidos ácido glutámico 580, ácido aspártico 582, ácido aspártico 592, fenilalanina 595, y glutamina 624 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el polipéptido HER2 comprende los aminoácidos 563-652 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el dominio transmembrana comprende los aminoácidos 653-675 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el polipéptido aislado comprende además un péptido líder que proporciona expresión en la superficie celular. En algunas alternativas, el péptido líder tiene la secuencia de SEQ ID NO: 17. En algunas alternativas, el anticuerpo es trastuzumab. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, el polipéptido aislado comprende al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % de identidad de secuencia con un polipéptido de un dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 unido a un dominio transmembrana, en donde el polipéptido aislado se une específicamente a un anticuerpo que se une a un epítipo en el Dominio IV de Her2, y en donde el polipéptido aislado excluye al HER2 maduro de longitud completa, y en donde el dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 está unido al dominio transmembrana mediante una secuencia que comprende los aminoácidos GGGSGGGS (SEQ ID NO: 45). En algunas alternativas, el polipéptido HER2 comprende los aminoácidos ácido glutámico 580, ácido aspártico 582, ácido aspártico 592, fenilalanina 595, y glutamina 624 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el polipéptido HER2 comprende los aminoácidos 563-652 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el dominio transmembrana comprende los aminoácidos 653-675 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el polipéptido aislado comprende además un péptido líder que proporciona expresión en la superficie celular. En algunas alternativas, el péptido líder comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 17. En algunas alternativas, el anticuerpo es trastuzumab. En algunas alternativas, el ácido nucleico aislado comprende además un promotor. En algunas alternativas, el ácido nucleico aislado comprende además un transgén. En algunas alternativas, el transgén comprende un polinucleótido que codifica un receptor antigénico quimérico. En algunas alternativas, el receptor antigénico quimérico comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio espaciador, un dominio transmembrana y al menos un dominio estimulador. En algunas alternativas, el polinucleótido que codifica el transgén está unido al ácido nucleico que codifica el polipéptido HER2 con un conector de autoescisión. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, el polipéptido HER2 comprende al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % de identidad de secuencia con un polipéptido de un dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 unido a un dominio transmembrana, en donde el polipéptido aislado se une específicamente a un anticuerpo que se une a un epítipo en el Dominio IV de Her2, y en donde el polipéptido aislado excluye al HER2 maduro de longitud completa. En algunas alternativas, el conector de autoescisión es un conector T2A que tiene la secuencia L E G G E G R G S L L T C G (SEQ ID NO: 26). En algunas alternativas, el receptor antigénico quimérico comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En algunas alternativas, el receptor antigénico quimérico comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 (CD20CAR). En algunas alternativas, la célula hospedadora se selecciona entre el grupo que consiste en linfocitos T CD8, linfocitos T CD4, linfocitos T CD4 sin activación previa, linfocitos T CD8 sin activación previa, linfocitos CD8 de memoria central, linfocitos CD4 de memoria central, y combinaciones de los mismos. En algunas alternativas, la célula hospedadora es autóloga. En algunas alternativas, la célula hospedadora es específica de antígeno. En algunas alternativas, las células hospedadoras son linfocitos T precursores. En algunas alternativas, las células hospedadoras son células madre hematopoyéticas.

En algunas alternativas, se proporciona una composición que comprende células hospedadoras en donde las células hospedadoras comprenden un ácido nucleico aislado, en donde el ácido nucleico aislado codifica un polipéptido. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, el polipéptido aislado comprende al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % de identidad de secuencia con un polipéptido de un dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 unido a un dominio transmembrana, en donde el polipéptido aislado se une específicamente a un anticuerpo que se une a un epítipo en el Dominio IV de Her2, y en donde el polipéptido aislado excluye al HER2 maduro de longitud completa. En algunas alternativas, el polipéptido HER2 comprende los aminoácidos ácido glutámico 580, ácido aspártico 582, ácido aspártico 592, fenilalanina 595, y glutamina 624 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el polipéptido HER2 comprende los aminoácidos 563-652 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el dominio transmembrana comprende los aminoácidos 653-675 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el polipéptido aislado comprende además un péptido líder que proporciona expresión en la superficie celular. En algunas alternativas, el péptido líder tiene la secuencia de SEQ ID NO: 17. En algunas alternativas, el anticuerpo es trastuzumab. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, el polipéptido aislado comprende al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % de identidad de secuencia con un polipéptido de un dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 unido a un dominio transmembrana, en donde el polipéptido aislado se une específicamente a un anticuerpo que se une a un epítipo en el Dominio IV de Her2, y en donde el polipéptido aislado excluye al HER2 maduro de longitud completa, y en donde el dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 está unido al dominio transmembrana mediante una secuencia que comprende los aminoácidos GGGSGGGS (SEQ ID NO: 45). En algunas alternativas, el polipéptido HER2 comprende los aminoácidos ácido glutámico 580, ácido aspártico 582, ácido aspártico 592, fenilalanina 595, y glutamina 624 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el polipéptido HER2 comprende los aminoácidos 563-652 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el dominio transmembrana comprende los aminoácidos 653-675 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el polipéptido aislado comprende además un péptido líder que proporciona expresión en la superficie celular. En algunas alternativas, el péptido líder comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 17. En algunas alternativas, el anticuerpo es trastuzumab. En algunas alternativas, el ácido nucleico aislado comprende además un promotor. En algunas alternativas, el ácido nucleico aislado comprende además un transgén. En algunas alternativas, el transgén comprende un polinucleótido que codifica un receptor antigénico quimérico. En algunas alternativas, el receptor antigénico quimérico comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio espaciador, un dominio transmembrana y al menos un dominio estimulador. En algunas alternativas, el polinucleótido que codifica el transgén está unido al ácido nucleico que codifica el polipéptido HER2 con un conector de autoescisión. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, el polipéptido HER2 comprende al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % de identidad de secuencia con un polipéptido de un dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 unido a un dominio transmembrana, en donde el polipéptido aislado se une específicamente a un anticuerpo que se une a un epítipo en el Dominio IV de Her2, y en donde el polipéptido aislado excluye al HER2 maduro de longitud completa. En algunas alternativas, el conector de autoescisión es un conector T2A que tiene la secuencia L E G G E G R G S L L T C G (SEQ ID NO: 26). En algunas alternativas, el receptor antigénico quimérico comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En algunas alternativas, el receptor antigénico quimérico comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 (CD20CAR). En algunas alternativas, la célula hospedadora se selecciona entre el grupo que consiste en linfocitos T CD8, linfocitos T CD4, linfocitos T CD4 sin activación previa, linfocitos T CD8 sin activación previa, linfocitos CD8 de memoria central, linfocitos CD4 de memoria central, y combinaciones de los mismos. En algunas alternativas, la célula hospedadora es autóloga. En algunas alternativas, la célula hospedadora es específica de antígeno. En algunas alternativas, las células hospedadoras son linfocitos T precursores. En algunas alternativas, las células hospedadoras son células madre hematopoyéticas.

En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, se proporciona un método para fabricar una composición, en donde el método comprende introducir un ácido nucleico aislado en una célula hospedadora y cultivar las células hospedadoras en un medio que comprende al menos un factor de crecimiento. En algunas alternativas, el ácido nucleico aislado codifica un polipéptido. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, el polipéptido aislado comprende al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % de identidad de secuencia con un polipéptido de un dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 unido a un dominio transmembrana, en donde el polipéptido aislado se une específicamente a un anticuerpo que se une a un epítipo en el Dominio IV de Her2, y en donde el polipéptido aislado excluye al HER2 maduro de longitud completa. En algunas alternativas, el polipéptido HER2 comprende los aminoácidos ácido glutámico 580, ácido aspártico 582, ácido aspártico 592, fenilalanina 595, y glutamina 624 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el polipéptido HER2 comprende los aminoácidos 563-652 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el dominio transmembrana comprende los aminoácidos 653-675 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el polipéptido aislado comprende además un péptido líder que proporciona expresión en la superficie celular. En algunas alternativas, el péptido líder tiene la secuencia de SEQ ID NO: 17. En algunas alternativas, el anticuerpo es trastuzumab. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, el polipéptido aislado comprende al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % de identidad de secuencia con un polipéptido de un dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 unido a un dominio transmembrana, en donde el polipéptido aislado se une específicamente a un anticuerpo que se une a un epítipo en el Dominio IV de Her2, y en donde el polipéptido aislado excluye al HER2 maduro de longitud completa, y en donde el dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 está unido al dominio transmembrana mediante

una secuencia que comprende los aminoácidos GGGSGGGS (SEQ ID NO: 45). En algunas alternativas, el polipéptido HER2 comprende los aminoácidos ácido glutámico 580, ácido aspártico 582, ácido aspártico 592, fenilalanina 595, y glutamina 624 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el polipéptido HER2 comprende los aminoácidos 563-652 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el dominio transmembrana comprende los aminoácidos 653-675 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el polipéptido aislado comprende además un péptido líder que proporciona expresión en la superficie celular. En algunas alternativas, el péptido líder comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 17. En algunas alternativas, el anticuerpo es trastuzumab. En algunas alternativas, el ácido nucleico aislado comprende además un promotor. En algunas alternativas, el ácido nucleico aislado comprende además un transgén. En algunas alternativas, el transgén comprende un polinucleótido que codifica un receptor antigénico quimérico. En algunas alternativas, el receptor antigénico quimérico comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio espaciador, un dominio transmembrana y al menos un dominio estimulador. En algunas alternativas, el polinucleótido que codifica el transgén está unido al ácido nucleico que codifica el polipéptido HER2 con un conector de autoescisión. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, el polipéptido HER2 comprende al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % de identidad de secuencia con un polipéptido de un dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 unido a un dominio transmembrana, en donde el polipéptido aislado se une específicamente a un anticuerpo que se une a un epítipo en el Dominio IV de Her2, y en donde el polipéptido aislado excluye al HER2 maduro de longitud completa. En algunas alternativas, el conector de autoescisión es un conector T2A que tiene la secuencia L E G G G E G R G S L L T C G (SEQ ID NO: 26). En algunas alternativas, el receptor antigénico quimérico comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En algunas alternativas, el receptor antigénico quimérico comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 (CD20CAR). En algunas alternativas, la célula hospedadora se selecciona entre el grupo que consiste en linfocitos T CD8, linfocitos T CD4, linfocitos T CD4 sin activación previa, linfocitos T CD8 sin activación previa, linfocitos CD8 de memoria central, linfocitos CD4 de memoria central, y combinaciones de los mismos. En algunas alternativas, la célula hospedadora es autóloga. En algunas alternativas, la célula hospedadora es específica de antígeno. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, el factor de crecimiento se selecciona entre el grupo que consiste en IL-15, IL-7, IL-21, IL-2, y combinaciones de los mismos. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, el método comprende además seleccionar células que expresan el polipéptido Her2t. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, las células se seleccionan antes de cultivar las células en el medio. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, las células se seleccionan usando un anticuerpo que se une al Dominio IV de Her2. En algunas alternativas, el anticuerpo es trastuzumab. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, el método comprende además introducir un segundo ácido nucleico aislado que codifica un receptor antigénico quimérico unido a una segunda etiqueta genética. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, el método comprende además seleccionar células que expresan la segunda etiqueta genética. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, la segunda etiqueta genética comprende EGFRt. En algunas alternativas, las células hospedadoras son linfocitos T precursores. En algunas alternativas, las células hospedadoras son células madre hematopoyéticas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Esquema estructural de Her2t. (Panel A) Modelo molecular de las regiones extracelular y transmembrana de Her2t (parte media) con respecto a Her2 (ErbB2; izquierda). Her2t en complejo con Fab Herceptin (derecha). (Panel B) Esquema de Her2t que contiene péptido líder formado por la secuencia señal de cadena a del receptor de GMCSF (GMCSFRss) para permitir expresión superficial. La secuencia de Her2t restante está formada por un epítipo del Dominio IV (89 aa) de Her2 (ErbB2) y una región transmembrana de 23-aa. (Panel C) Her2t se clonó en marco cadena abajo para el CAR y T2A para permitir la coexpresión.

Figura 2. Asociados de Her2t con trastuzumab (Herceptin) para enriquecer inmunomagnéticamente células que expresan Her2t. (Panel A) Titulación de Herceptin biotinado frente a una línea celular que expresa Her2. (Panel B) Células K562 transducidas con Her2t antes y después de selección usando Herceptin biotinado y microperlas anti-biotina (Miltenyi). Células purificadas hasta un 95 % de Her2t positivo. (Panel C) Herceptin reconoce específicamente el epítipo de Her2t y los anticuerpos Her2t comerciales no lo reconocen. (Panel D) Análisis de transferencia de Western usando un anticuerpo comercial (parte superior) o Herceptin biotinado (parte inferior) a modo de ejemplo de la diferencia de tamaño en kDa entre Her2t (25 kDa) y ErbB2 (250 kDa). Carriles de izquierda a derecha (1-4): escala de MW, K562 parental, K562 Her2t, K562 ErbB2 (Her2).

Figura 3. Her2t es un marcador de selección eficaz en concierto con EGFRt en linfocitos T de memoria central (Tcm). (Panel A) Purificación de Tcm CD8 de PBMC usando un esquema de purificación en columna de dos etapas. Las células CD8+CD45RA- se seleccionan inicialmente usando un kit de aislamiento de CD8 (para enriquecer las células CD8 positivas) y microperlas de CD45RA (para eliminar las células CD45RA positivas). A continuación, las células se seleccionan positivamente usando microperlas de CD62L. (Panel B) Tcm CD8 transducidos con CD19CAR-T2A-Her2, CD20CAR-T2A-EGFRt, o ambos seleccionados usando Herceptin biotinado o Erbitux y microperlas anti-biotina. Tcm CD8 transducidos con CD19CAR-T2A-Her2t y CD20CAR-T2A-EGFRt (Ambos) pueden purificarse secuencialmente permitiendo un linfocito T de doble especificidad para terapia con CAR. El quinto panel va con el histograma de Tcm purificados dobles (Ambos). El histograma superior muestra la tinción de Herceptin con SA-PE (Her2t+) y el histograma inferior muestra la tinción de Erbitux con SA-PE (EGFRt+) para los Tcm purificados dobles. (Panel C) Análisis de transferencia de Western usando un anticuerpo específico CD3ζ en lisados celulares de Tcm CD8 purificados con Her2t o EGFRt. Carriles de izquierda a derecha (1-4): escala de MW, transducido simuladamente, transducido con CD19CAR-T2A-Her2t, transducido con CD19CAR-T2A-EGFRt. Las intensidades de banda demuestran que aunque la

MFI en (Panel B) es menor para las células teñidas con Her2t, las células purificadas con Her2t tienen niveles de expresión transgénica más altos que las células purificadas con EGFRt. Bandas superiores = CD19CAR; Bandas inferiores = CD3 ζ endógeno. Una comparación de intensidades de banda entre la cadena zeta de CAR (panel superior-50 kDa) y la cadena zeta interna de los linfocitos T hospedador es (panel inferior-15 kDa) muestra que las células que expresan el constructo CARher2t tenían aproximadamente 2 veces más expresión de CAR en comparación con el constructo CAREGFRt.

Figura 4. Las células transducidas con Her2t y Her2t/EGFRt mantienen el fenotipo efector y la especificidad de diana. (Panel A) Caracterización del panel de diana de K562 de izquierda a derecha: K562 parental, K562 CD19, K562 CD20 y K562 CD19/CD20 (eje X: CD19+; eje Y: CD20+). (Panel B) Ensayo de liberación de cromo de 4 horas que muestra la especificidad de los linfocitos T CD19 y CD20-CAR frente a células del panel de diana de K562. Se cocultivaron Tcm CD8 con células diana K562 en una relación de 50:1, 25:1, 12,5:1 o 6,25:1. Solo los linfocitos T de doble transducción pudieron dirigirse a todas las células K562 que expresan antígenos. Los Tcm CD8 CD19CAR-T2A-Her2t y CD19CAR-T2A-EGFRt demuestran una capacidad lítica similar. (Panel C) Ensayo de liberación de citoquinas de 24 horas. Se cocultivaron Tcm CD8 con células diana K562 en una relación de linfocitos T con respecto a diana de 2:1 durante 24 horas y a continuación el sobrenadante se analizó para determinar la presencia de citoquinas efectoras. Los Tcm CD8 transducidos con CD19CAR-T2A-Her2t produjeron un repertorio más diverso y niveles más altos de citoquinas efectoras con respecto a los Tcm CD8 transducidos con CD19CAR-T2A-EGFRt. Los paneles son los mismos que los de A y B (de izquierda a derecha: K562 parental, K562 CD19, K562 CD20 y K562 CD19/CD20). Para Tcm CD4 se observaron resultados similares (datos no mostrados). (Panel D) veces de producción de citoquinas representativo a partir del ensayo de liberación de citoquinas de 24 horas. Los Tcm CD8 purificados con Her2t (CD19CAR-Her2t) producen niveles de citoquinas efectoras de IL2, IFN γ y TNFa significativamente más altos cuando se cocultivan con CD19 que expresa K562 (parte superior) en comparación con CD19CAR-EGFRt. Ensayo t de Student $p > 0,05$.

Figura 5. Uso de Her2t como marcador para detección *in vivo* y tinción fluorescente de células manipuladas. (Panel A) Los Tcm CD4 y CD8 que expresan CD19CAR-T2A-Her2t o CD19CAR-T2A-EGFRt (10^7) se inyectaron por vía intravenosa en ratones nuligénicos NOD/scid IL-2RyC junto con una inyección subcutánea de 5×10^6 células NS0-IL15 para proporcionar suministro sistémico de IL-15 humana. La médula ósea se recogió 14 días después de la inyección y las suspensiones celulares se analizaron mediante citometría de flujo. (Panel B) tres paneles que muestran células seleccionadas para células viables (93,6 % de linfocitos), individuales (98,8 %) y vivas (99,9 %). (B) Tinción de CD8 y CD45 de izquierda a derecha (Simulado, CD19CAR-T2A-Her2t, Tcm CD19CAR-T2A-EGFRt). Se registraron al menos 1×10^7 células dentro de las selecciones viables, individuales y vivas. Entonces, aunque las células CD45+ representan aproximadamente un 1 % de la población, es equivalente a 1×10^5 células. Las células restantes son células de médula ósea de ratón. (Panel C) Se cotiñeron células CD45+ humanas con Herceptin biotinado o Erbitux y SA-APC. Se identificaron Tcm de médula ósea que expresaban Her2t o EGFRt. (Panel D) Se adhirieron células que expresan TM-LCL parental, Her2(ErbB2) o Her2t a portaobjetos usando poli-L-lisina y a continuación se tiñeron usando Herceptin biotinado y SA-AF647. La tinción solo estuvo presente para células que expresan Her2 o Her2t cuando se tiñeron con Herceptin biotinado y SA-AF647.

Figura 6. Purificación de multclasificación de linfocitos T positivos para Her2t y EGFRt. Las células H9 (5×10^6 parentales, Her2t⁺, EGFRt⁺, o Her2t⁺/EGFRt⁺) se mezclaron juntas y a continuación se sometieron a purificación. Las células se purificaron inicialmente basándose en Herceptin biotinado y perlas de multclasificación anti-biotina. A continuación, se retiraron las perlas de multclasificación y la fracción positiva se sometió posteriormente a una purificación basándose en microperlas de Erbitux-APC y anti-APC. La fracción positiva final fue doble positiva para Her2t y EGFRt.

Figura 7. Se diseñaron tres variantes de Her2t (bisagra de CD28, bisagra de IgG4 o Her2tG) para mejorar la unión al anticuerpo Herceptin. Se muestra un esquema general que indica dónde se insertaron las nuevas secuencias en Her2t. Figura 8. Her2tG presenta una unión mejorada a Herceptin. Las células H9 se transdujeron con lentivirus a una MOI de 1 con Her2t o Her2tG. A continuación, las células transducidas se purificaron mediante Herceptin biotinado y microperlas anti-biotina de acuerdo con el protocolo de los fabricantes. Las poblaciones purificadas se tiñeron posteriormente para Her2t o Her2tG usando Herceptin biotinado y estreptavidina-PE. Los histogramas muestran una mayor unión a Her2tG.

Figura 9. Her2tG muestra la mayor capacidad para unirse a Herceptin. Las células H9 se transdujeron con lentivirus a 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1 y 3 ul (de izquierda a derecha) y a continuación se analizaron para determinar la unión a Herceptin cinco días después. La variante de Her2t, Her2t(bisagra de CD28), fue capaz de unirse a Herceptin a niveles similares a los de Her2t original (la tinción de Her2t no se muestra, pero se basa en la experiencia previa). Her2t(bisagra de IgG4) mejoró la unión a Herceptin con respecto al Her2t o Her2t(bisagra de CD28), mientras que la variante Her2tG tenía la mayor capacidad para unirse a Herceptin y teñir células H9 transducidas.

Definiciones

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la materia a la que pertenece la invención.

"Aproximadamente", como se usa en el presente documento cuando se refiere a un valor medible, pretende abarcar variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, más preferentemente $\pm 5\%$, incluso más preferentemente $\pm 1\%$, y aún más preferentemente $\pm 0,1\%$ del valor especificado.

"Antígeno" o "Ag", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que provoca una respuesta inmunitaria. Esta respuesta inmunitaria puede implicar la producción de anticuerpos o la activación de células inmunológicamente competentes específicas, o ambas. Es inmediatamente evidente que un antígeno puede generarse, sintetizarse, producirse de forma recombinante o puede derivarse de una muestra biológica. Tal muestra biológica puede incluir, pero no se limita a, una muestra tisular, una muestra tumoral, una célula o un fluido biológico, tal como, por ejemplo, sangre, plasma y fluido ascítico.

"Efecto antitumoral", como se usa en el presente documento, se refiere a un efecto biológico, que puede manifestarse por una disminución del volumen tumoral, una disminución del número de células tumorales, una disminución del número de metástasis, un aumento de la esperanza de vida, o una disminución de diversos síntomas fisiológicos asociados a la afección cancerosa. Un "efecto antitumoral" también puede manifestarse por una disminución de la recurrencia o un aumento del tiempo antes de la recurrencia. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, se proporciona un método para tratar a un paciente en donde el método comprende administrar una cantidad eficaz de una composición, en donde la composición comprende células, en donde las células de la composición expresan un receptor antigénico quimérico que comprende un dominio de unión a antígeno que se une al antígeno tumoral expresado en la célula cancerosa y una etiqueta genética. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, la composición tiene efecto antitumoral.

"Receptor quimérico", como se usa en el presente documento, se refiere a un receptor diseñado sintéticamente que comprende un dominio de unión a ligando de un anticuerpo u otra secuencia proteica que se une a una molécula asociada a la enfermedad o trastorno y se une mediante un dominio espaciador a uno o más dominios de señalización intracelular de un linfocito T u otros receptores, tales como un dominio coestimulador. Los receptores quiméricos también pueden denominarse receptores de linfocitos T artificiales, receptores de linfocitos T quiméricos, inmunorreceptores quiméricos y receptores antigénicos quiméricos (CAR). Estos CAR son receptores manipulados que pueden injertar una especificidad arbitraria en una célula receptora inmunitaria. Algunos investigadores se refieren a receptores antigénicos quiméricos o "CAR" que incluyen el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, el espaciador, dominio de señalización y región transmembrana. Sin embargo, debido a los efectos sorprendentes de modificación de los diferentes componentes o dominios del CAR, tales como la región de unión a epítipo (por ejemplo, fragmento de anticuerpo, scFv o porción del mismo), espaciador, dominio transmembrana y/o dominio de señalización, los componentes del CAR se describen en algunos contextos en el presente documento como elementos independientes. La variación de los diferentes elementos del CAR puede conducir, por ejemplo, a una afinidad de unión más fuerte hacia un epítipo específico.

"Dominio coestimulador", como se usa el término en el presente documento, se refiere a un resto de señalización que proporciona a los linfocitos T una señal que, además de la señal primaria proporcionada, por ejemplo, por la cadena zeta de CD3 del complejo TCR/CD3, media una respuesta de linfocitos T, que incluye, pero no se limita a, activación, proliferación, diferenciación, secreción de citoquinas y similares. Un dominio coestimulador puede incluir todo o una porción de, pero sin limitarse a, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, ICOS, antígeno 1 asociado a función linfocitaria (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, y/o un ligando que se une específicamente a CD83. En algunas alternativas, el dominio coestimulador es un dominio de señalización intracelular que interactúa con otros mediadores intracelulares para mediar una respuesta celular que incluye activación, proliferación, diferenciación y secreción de citoquinas, y similares. En algunas alternativas descritas en el presente documento, el receptor antigénico quimérico comprende un dominio coestimulador.

"Codificar", como se usa en el presente documento, se refiere a la propiedad de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, tales como un gen, un ADNc o un ARNm, de servir como moldes para síntesis de otras macromoléculas tales como una secuencia de aminoácidos definida. Codificar puede usarse indistintamente con el término "codificación". Por lo tanto, un gen codifica una proteína si la transcripción y la traducción del ARNm correspondiente a ese gen producen la proteína en una célula u otro sistema biológico. Una "secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y que codifican la misma secuencia de aminoácidos.

"Linfocito T citotóxico" (CTL), como se usa en el presente documento, se refiere a un linfocito T que expresa CD8 en su superficie (es decir, un linfocito T CD8⁺). En algunas alternativas, tales células son preferentemente linfocitos T de "memoria" (linfocitos T_M) que son presentadores de antígenos.

"Linfocito T de memoria central" (o "T_{CM}"), como se usa en el presente documento, se refiere a un CTL presentador de antígeno que expresa CD62L o CCR-7 y CD45RO en su superficie, y no expresa o tiene una expresión disminuida de CD45RA en comparación con células sin activación previa. En algunas alternativas, las células de memoria central son positivas para expresión de CD62L, CCR7, CD28, CD 127, CD45RO y/o CD95, y/o tienen una expresión disminuida de CD54RA en comparación con las células sin activación previa. En algunas alternativas, se proporciona una célula hospedadora en donde la célula hospedadora es específica de antígeno. En algunas alternativas, la célula es un linfocito T de memoria central.

Linfocito T de "memoria efectora" (o "T_{EM}"), como se usa en el presente documento se refiere a un linfocito T presentador de antígeno que no expresa o tiene una expresión disminuida de CD62L en su superficie en comparación

con células de memoria central, y no expresa o tiene una expresión disminuida de CD45RA en comparación con células sin activación previa. En algunas alternativas, las células de memoria efectoras son negativas para expresión de CD62L y CCR7, en comparación con células sin activación previa o células de memoria central, y tienen una expresión variable de CD28 y CD45RA. En algunas alternativas, se proporciona una célula hospedadora en donde la célula hospedadora es específica de antígeno. En algunas alternativas, la célula es un linfocito T de memoria efectora.

Linfocito T "sin activación previa", como se usa en el presente documento, se refiere a linfocitos T no presentadores de antígenos que expresan CD62L y CD45RA, y no expresan CD45RO- en comparación con células de memoria, central o efectora. En algunas alternativas, los linfocitos T CD8+ sin activación previa se caracterizan por la expresión de marcadores fenotípicos de linfocitos T sin activación previa que incluyen CD62L, CCR7, CD28, CD127, y/o CD45RA. En algunas alternativas, se proporciona una célula hospedadora en donde la célula hospedadora es específica de antígeno. En algunas alternativas, la célula es un linfocito T sin activación previa.

Linfocitos T "efectores" "T_E", como se usa en el presente documento, se refiere a linfocitos T citotóxicos presentadores de antígenos que no expresan o tienen disminución de la expresión de CD62L, CCR7, y/o CD28, y son positivos para granzima B y/o perforina en comparación con linfocitos T de memoria central o sin activación previa. En algunas alternativas, se proporciona una célula hospedadora en donde la célula hospedadora es específica de antígeno. En algunas alternativas, la célula es un linfocito T efector.

"Precusores de linfocitos T", como se describe en el presente documento, se refiere a células precursoras linfoides que pueden migrar al timo y convertirse en precursores de linfocitos T, que no expresan un receptor de linfocitos T. Todos los linfocitos T se originan a partir de células madre hematopoyéticas en la médula ósea. Los progenitores hematopoyéticos (células progenitoras linfoides) de células madre hematopoyéticas pueblan el timo y se expanden mediante división celular para generar una gran población de timocitos inmaduros. Los timocitos más precoces no se expresan ni en CD4 ni en CD8, y por lo tanto se clasifican como células doble negativas (CD4⁻CD8⁻). A medida que progresan hacia su desarrollo, se convierten en timocitos doble positivos (CD4⁺CD8⁺), y finalmente en timocitos maduros a un único positivo (CD4⁺CD8⁻ o CD4⁻CD8⁺) que a continuación se liberan del timo a tejidos periféricos.

Aproximadamente un 98 % de timocitos mueren durante los procesos de desarrollo en el timo al fracasar en la selección positiva o en la selección negativa, mientras que el otro 2 % sobrevive y abandona el timo para convertirse en linfocitos T inmunocompetentes maduros.

La etapa doble negativa (DN) del linfocito T precursor se centra en producir una cadena β funcional, mientras que la etapa doble positiva. (DP) se centra en producir una cadena α funcional, que finalmente produce un receptor de linfocitos T $\alpha\beta$ funcional. A medida que el timocito en desarrollo progresa a través de las cuatro etapas DN (DN1, DN2, DN3 y DN4), el linfocito T expresa una cadena α invariante pero reordena el locus de la cadena β . Si la cadena β reordenada se empareja con éxito con la cadena α invariante, se producen señales que cesan la reordenación de la cadena β (y silencian el alelo alternativo) y dan como resultado la proliferación de la célula. Aunque estas señales requieren este pre-TCR en la superficie celular, dependen de la unión del ligando al pre-TCR. Estos timocitos a continuación expresarán tanto CD4 como CD8 y progresarán a la etapa doble positiva (DP) donde se produce la selección de la cadena α . Si una cadena β reordenada no conduce a ninguna señalización (por ejemplo, como resultado de la incapacidad de emparejarse con la cadena α invariante), la célula puede morir por negligencia (falta de señalización).

Las "células madre hematopoyéticas" o "HSC", como se describe en el presente documento, son células precursoras que pueden dar lugar a células mieloides tales como, por ejemplo, macrófagos, monocitos, macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrocitos, megacariocitos/plaquetas, células dendríticas y linajes linfoides (tales como, por ejemplo, linfocitos T, linfocitos B, linfocitos NK). Las HSC tienen una población heterogénea en la que existen tres clases de células madre, que se distinguen por su proporción de progenie linfóide a mielóide en la sangre (L/M).

"Enriquecido" y "empobrecido", como se usa en el presente documento para describir cantidades de tipos celulares en una mezcla, se refiere a someter la mezcla de las células a un proceso o etapa que da como resultado un aumento del número de células de tipo "enriquecido" y una disminución del número de células "empobrecidas". Por lo tanto, dependiendo de la fuente de la población original de células sometidas al proceso de enriquecimiento, una mezcla o composición puede contener un 60, 70, 80, 90, 95 o 99 por ciento o más (en número o recuento) de las células "enriquecidas", incluyendo cualquier número entero entre dos puntos finales de cualquiera de los valores enumerados y un 40, 30, 20, 10, 5 o 1 por ciento o menos (en número o recuento) de las células "empobrecidas", incluyendo cualquier número entero entre dos puntos finales de cualquiera de los valores enumerados.

"Epítipo", como se usa en el presente documento, se refiere a una parte de un antígeno o molécula que es reconocida por el sistema inmunitario, incluyendo anticuerpos, linfocitos T y/o linfocitos B. Los epítipos suelen tener al menos 7 aminoácidos y pueden ser lineales o conformacionales.

"Her2" o "ERBB2" se refiere a un receptor de proteína quinasa unido a la membrana que necesita un correceptor para unión a ligando. Una secuencia polipeptídica de referencia a modo de ejemplo para Her2 se encuentra en el registro P04626 de Uniprot y SEQ ID NO: 23 (Tabla 8). La secuencia de referencia de longitud completa tiene 1255

aminoácidos incluyendo la secuencia señal de los aminoácidos 1-22, dominio extracelular de los aminoácidos 23-652, dominio transmembrana de los aminoácidos 653-675 y dominio citoplásmico de los aminoácidos 676-1255 como se muestra en la Tabla 8. La secuencia polipeptídica madura de longitud completa tiene 1233 aminoácidos ya que la secuencia líder no está incluida en el polipéptido maduro. Se conocen varias variantes e isoformas de origen natural.

5 Una secuencia de referencia nucleica se encuentra en Genbank X03363/g1 31197. El dominio extracelular tiene 4 regiones que corresponden a: aminoácidos 23-217 del Dominio I; aminoácidos 218 a 341 del dominio; aminoácidos 342 a 510 del dominio III; y aminoácidos 511 a 562 del Dominio IV de SEQ ID NO: 23.

"Her2t" se refiere a un fragmento de la secuencia Her2, y es útil como etiqueta genética para expresión transgénica.

10 En algunas alternativas, Her2t comprende el dominio IV del dominio extracelular de Her2 y excluye a Her2 de longitud completa. En algunas alternativas, Her2t se une específicamente a un anticuerpo específico para el Dominio IV de Her2. En otras alternativas, Her2t comprende los aminoácidos 511 a 562 o 563-652 de SEQ ID NO: 23.

"Aislado", se usa para describir los diversos polipéptidos desvelados en el presente documento, y significa polipéptido o ácido nucleico que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Preferentemente, el polipéptido aislado o ácido nucleico no tiene asociación con todos los componentes con los que está asociado naturalmente. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que normalmente podrían interferir con los usos diagnósticos o terapéuticos del polipéptido o ácido nucleico, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos.

15

"Dominio de señalización intracelular", como se usa en el presente documento, se refiere a todo o porción de uno o más dominios de una molécula (en este caso, la molécula receptora quimérica) que proporciona la activación de un linfocito. Los dominios intracelulares de tales moléculas median una señal al interactuar con mediadores celulares para dar como resultado proliferación, diferenciación, activación y otras funciones efectoras. En algunas alternativas, tales moléculas incluyen todas o porciones de CD28, CD3 y/o 4-1BB, o combinaciones de los mismos.

20

"Ligando", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que se une específicamente a otra sustancia para formar un complejo. Algunos ejemplos de ligandos incluyen epítopos sobre antígenos, moléculas que se unen a receptores, sustratos, inhibidores, hormonas y activadores. "Dominio de unión a ligando", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia o porción de una sustancia que se une a un ligando. Algunos ejemplos de dominios de unión a ligandos incluyen porciones de anticuerpos que se unen a antígenos, dominios extracelulares de receptores y sitios activos de enzimas.

25

"Unido operativamente", como se usa en el presente documento, se refiere a la unión funcional entre una secuencia reguladora y una secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que da como resultado la expresión de la última. Por ejemplo, una primera secuencia de ácidos nucleicos está unida operativamente a una segunda secuencia de ácidos nucleicos cuando la primera secuencia de ácidos nucleicos se coloca en una relación funcional con la segunda secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante si el promotor influye en la transcripción o expresión de la secuencia codificante. Generalmente, las secuencias de ADN unidas operativamente son contiguas y, cuando sea necesario, son para unir dos regiones codificantes de proteínas, en el mismo marco de lectura.

30

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos", con respecto a las secuencias polipeptídicas de etiqueta genética identificadas en el presente documento, se define como el porcentaje de restos de aminoácido en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácido en la secuencia de referencia después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para conseguir el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento con el propósito de determinar el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos puede conseguirse de varias formas que están dentro de la experiencia en la materia, por ejemplo, usando software informático disponible públicamente tal como BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o el software Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el alineamiento máximo en toda la longitud de las secuencias que se comparan. Por ejemplo, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos generados usando el programa informático WU-BLAST-2 [Altschul *et al.*, Methods in Enzymology, 266:460-480 (1996)] usa varios parámetros de búsqueda, la mayoría de los cuales se establecen en valores predeterminados. Los que no están configurados con valores predeterminados (es decir, los parámetros ajustables) se configuran con los siguientes valores: intervalo de superposición = 1, fracción de superposición = 0,125, umbral de palabra (T) = 1 1 y matriz de puntuación = BLOSUM62. Un % del valor de identidad de la secuencia de aminoácidos se determina dividiendo (a) el número de restos de aminoácido idénticos emparejados entre cada una o todas las secuencias de aminoácidos del polipéptido de la secuencia de referencia Her2 proporcionada en SEQ ID NO: 15 o los aminoácidos 563-652 de SEQ ID NO: 23 y la secuencia de aminoácidos de interés de comparación determinada por WU-BLAST-2 entre (b) el número total de restos de aminoácido del polipéptido de interés.

35

40

45

50

55

60

"Polinucleótido variante de etiqueta genética" como se usa en el presente documento se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica polipéptido como se define a continuación que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos con la secuencia de polinucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 15 o

65

nucleótidos o un fragmento derivado específicamente de los mismos. Generalmente, una variante de polinucleótido o fragmento del mismo tendrá al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, más preferentemente al menos aproximadamente un 81 % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, más preferentemente al menos aproximadamente un 82 % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, más preferentemente al menos aproximadamente un 83 % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, más preferentemente al menos aproximadamente un 84 % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, más preferentemente al menos aproximadamente un 85 % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, más preferentemente al menos aproximadamente un 86 % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, más preferentemente al menos aproximadamente un 87 % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, más preferentemente al menos aproximadamente un 88 % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, más preferentemente al menos aproximadamente un 89 % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, más preferentemente al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, más preferentemente al menos aproximadamente un 91 % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, más preferentemente al menos aproximadamente un 92 % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, más preferentemente al menos aproximadamente un 93 % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, más preferentemente al menos aproximadamente un 94 % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, más preferentemente al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, más preferentemente al menos aproximadamente un 96 % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, más preferentemente al menos aproximadamente un 97 % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, más preferentemente al menos aproximadamente un 98 % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos y aún más preferentemente al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos con la secuencia de ácidos nucleicos como se muestra en SEQ ID NO: 14 o un fragmento derivado de la misma, o cualquier porcentaje de identidad de secuencia de ácidos nucleicos entre cualesquiera dos de los valores del porcentaje de identidad de secuencia de ácidos nucleicos enumerados. Las variantes no abarcan la secuencia de nucleótidos nativa. En este sentido, debido a la degeneración del código genético, alguien con experiencia en la materia reconocerá inmediatamente un gran número de polinucleótidos de variante de receptor quimérico que tienen al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 14 o nucleótidos que codifican un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18.

"Sustancialmente purificada" se refiere a una molécula que tiene un 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, o un 1 % o menos de otros tipos de moléculas u otros tipos de células, o cualquier valor entre cualesquiera dos de los valores de porcentaje de purificación enumerados. Una célula sustancialmente purificada también se refiere a una célula que se ha separado de otros tipos de células con los que normalmente está asociada en su estado natural. En algunos casos, una población celular sustancialmente purificada se refiere a una población homogénea de células.

"No encontrado sustancialmente" cuando se usa en referencia a la presencia de un antígeno tumoral u otras moléculas en células normales se refiere al porcentaje de un tipo de célula normal que tiene el antígeno o molécula, y/o la densidad del antígeno en las células. En algunas alternativas, no encontrado sustancialmente significa que el antígeno o molécula se encuentra en menos de un 50 % del tipo de célula normal y/o en un 50 % menos de densidad en comparación con la cantidad de células o antígeno encontrados en una célula tumoral u otra célula enferma.

Las "células T" o "linfocitos T" como se usa en el presente documento pueden ser de cualquier especie de mamífero, preferentemente primate, incluyendo monos, perros y seres humanos. En algunas alternativas, los linfocitos T son alogénicos (de la misma especie pero de diferente donante) que el sujeto receptor; en algunas alternativas, los linfocitos T son autólogos (el donante y el receptor son el mismo); en algunas alternativas, los linfocitos T son singénicos (el donante y los receptores son diferentes pero son gemelos idénticos).

"Vector" o "constructo" es un ácido nucleico usado para introducir ácidos nucleicos heterólogos en una célula que tiene elementos reguladores para proporcionar expresión de los ácidos nucleicos heterólogos en la célula. Los vectores incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, minicírculos, levadura y genomas virales.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente divulgación proporciona un polipéptido de etiqueta genética o variante del mismo y un ácido nucleico que codifica la etiqueta genética útil para proporcionar un marcador de selección y/o un marcador de identificación para células que expresan transgén.

Etiqueta genética transgénica y polipéptidos y variantes

Un aspecto de la divulgación proporciona una etiqueta genética para expresión transgénica que proporciona expresión estable de la expresión del transgén en células. En algunas alternativas, la etiqueta genética proporciona selección de células transducidas que expresan el transgén a niveles comparables para genes endógenos. En algunas alternativas, la etiqueta genética se expresa en la superficie celular, tiene inmunogenicidad disminuida, no aumenta sustancialmente la carga genética en un vector, y/o proporciona expresión transgénica en una diversidad de células.

En algunas alternativas, la etiqueta genética es un fragmento de Her2 denominado Her2t que al menos incluye un

epítipo reconocido por un anticuerpo anti-Her2. En algunas alternativas, el anticuerpo se une específicamente al Dominio IV de Her2. En otras alternativas, el anticuerpo se une específicamente al Dominio IV de Her2 y no se une a epítipos en los dominios I, II y/o III de Her2. En algunas alternativas, el anticuerpo anti-Her2 es un anticuerpo terapéuticamente útil para tratar cáncer. En algunas alternativas, el epítipo es reconocido por trastuzumab (Herceptin).

En algunas alternativas, el epítipo es reconocido por trastuzumab y/o anticuerpos que compiten por unirse con trastuzumab pero no con otros anticuerpos anti-Her2 que se unen, por ejemplo, a epítipos en los dominios I, II y/o III de Her2.

En una alternativa específica, el epítipo incluye aminoácidos determinados por la estructura cristalina de Her2 en complejo con Fab Herceptin (Cho *et al.*, Nature (2003) 421:756). La interacción entre Her2 y Herceptin se produce entre tres regiones de bucle (dos electrostáticas y una hidrófoba) en el Dominio IV. Los aminoácidos interactivos fundamentales en HER2 hacia Herceptin son los siguientes: bucle 1 (electrostático), que incluye la secuencia de aminoácidos 580-584 EADQC (incluyendo Glu 580 y Asp 582) (SEQ ID NO: 42), bucle 2 (hidrófobo) que incluye secuencia de aminoácidos 592-595 DPPF (incluyendo Asp 592 y Phe 595) (SEQ ID NO: 43), y bucle 3 (electrostático) que incluye la secuencia de aminoácidos 616-625 FPDEEGACQP (incluyendo Gln 624) (SEQ ID NO: 44) (el sistema de numeración de aa se basa en toda la secuencia de ErbB2 (Her2) de ErbB2 (Her2) de SEQ ID NO: 23, incluyendo la secuencia de señalización y como se muestra en la Tabla 8). El uso del sistema de numeración de Cho *et al.*, retira los 22 aa de la secuencia señal dando como resultado los siguientes aminoácidos de HER2 involucrados con Herceptin: bucle 1 Glu 558 y Asp 560, bucle 2 Asp 570 y Phe 573, y bucle 3 Gln 602. En algunas alternativas, un fragmento Her2 contiene al menos estos restos de aminoácido y se selecciona además para unirse a trastuzumab o un anticuerpo que compite por unirse con trastuzumab cuando se expresa en la superficie celular. Aunque no se pretende limitar el alcance de la divulgación, se cree que un fragmento Her2t que contiene al menos los aminoácidos 563-652 incluye un epítipo que puede unirse a trastuzumab como un epítipo más pequeño que contiene los aminoácidos 578 a 652 sin unir a trastuzumab. En algunas alternativas, el fragmento Her2t comprende los aminoácidos 563-652 de Her2t. En algunas alternativas, el fragmento Her2t comprende las secuencias de aminoácidos 580-584 de Her2t, las secuencias de aminoácidos 592-595 de Her2t y las secuencias de aminoácidos 616-625 de Her2t.

En una alternativa específica, un fragmento de Her2 comprende, consiste esencialmente en, o consiste en los aminoácidos 511-652 (Dominio IV) o 563-652 como se muestra en la Tabla 6 (SEQ ID NO: 18). En algunas alternativas, una variante del fragmento Her2 tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 18 o un porcentaje de identidad de secuencia que se encuentra entre un intervalo definido por cualesquiera dos cualesquiera de los porcentajes mencionados anteriormente, y cuando se expresa en la superficie celular se une a trastuzumab. En algunas alternativas, el fragmento variante tiene al menos 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 sustituciones de aminoácidos, preferentemente sustituciones de aminoácidos conservativas. Tales sustituciones pueden identificarse usando la estructura cristalina de Her2 en complejo con Fab Herceptin (Cho *et al.*, Nature (2003)). En algunas alternativas, el fragmento variante no incluye sustitución de aminoácidos en los restos implicados en la unión a trastuzumab como se describe en el presente documento. En algunas alternativas, el fragmento incluye restos en el Dominio IV de Her2 y excluye uno o más dominios de Her2 incluyendo el dominio I, dominio II, dominio III y/o dominios intracelulares.

En algunas alternativas, la etiqueta genética genera poca o ninguna respuesta inmunitaria. En algunas alternativas, una etiqueta genética se selecciona entre proteínas de origen endógeno para aprovechar la tolerancia del sujeto a proteínas endógenas. En algunas alternativas, la etiqueta genética se analiza con software para predecir epítipos antigénicos tales como el algoritmo de predicción del procesamiento de péptidos antigénicos MHC-I. Para determinantes antigénicos se analiza una secuencia: MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPCHPECQPQNGSVT (SEQ ID NO: 16). En algunas alternativas, la secuencia de ácidos nucleicos de la etiqueta genética se deriva y/o se modifica a partir de la secuencia de la línea germinal para su incorporación en un constructo transgénico artificial o sintético.

En algunas alternativas, una etiqueta genética incluye además un dominio transmembrana. El dominio transmembrana puede derivarse de una fuente natural o sintética. Cuando la fuente es natural, el dominio puede derivarse de cualquier proteína unida a membrana o transmembrana. Las regiones transmembrana comprenden al menos la región o regiones transmembrana de) la cadena alfa, beta o zeta del receptor de linfocitos T, CD28, CD3, CD45, CD4, CD8, CD9, CD16, CD22; CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 y/o CD154. En una alternativa específica, el dominio transmembrana comprende la secuencia de aminoácidos del dominio transmembrana de Her2 como se muestra en la Tabla 6 (por ejemplo, aminoácidos 653-675 (SEQ ID NO: 20). En la Tabla 6 se muestra una secuencia polinucleotídica representativa que codifica el dominio transmembrana de Her2 (SEQ ID NO: 19).

En algunas alternativas, los dominios transmembrana sintéticos o variantes comprenden restos predominantemente hidrófobos, tales como leucina y valina. En algunas alternativas, un dominio transmembrana puede tener al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o un 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un dominio transmembrana como se muestra en la Tabla 6 o un porcentaje de identidad de secuencia que esté entre un intervalo definido por cualesquiera dos de los porcentajes mencionados anteriormente. Los dominios transmembrana variantes tienen preferentemente una puntuación hidrófoba de al menos 50 calculado con Kyte Doolittle.

En algunas alternativas, una etiqueta genética incluye un péptido que aumenta la expresión superficial de la etiqueta genética. Tales péptidos incluyen, por ejemplo, la secuencia señal del factor de estimulación de granulocitos y

macrófagos, péptido líder de Her2 endógeno (aa 1-22), péptidos señal de tipo I, péptido señal de IgGk, y/o secuencia líder de CD8. En algunas alternativas, la secuencia líder tiene una secuencia de SEQ ID NO: 17.

En una alternativa específica, una etiqueta genética comprende un fragmento de Her2 que se une a trastuzumab, y un dominio transmembrana a modo de ejemplo en SEQ ID NO: 20. En otra alternativa específica, una etiqueta genética comprende un péptido que aumenta la expresión superficial, un fragmento de Her2 que se une a trastuzumab, y un dominio transmembrana a modo de ejemplo en SEQ ID NO: 15. En algunas alternativas, una variante de la etiqueta genética tiene un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 20 o un porcentaje de identidad de secuencia que esté entre un intervalo definido por cualesquiera dos de los porcentajes mencionados anteriormente, y cuando se expresa en la superficie celular se une a trastuzumab. En algunas alternativas, el fragmento variante tiene al menos 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 sustituciones de aminoácidos, preferentemente sustituciones de aminoácidos conservativas. En algunas alternativas, el fragmento variante no incluye sustitución de aminoácidos en los restos implicados en la unión a trastuzumab.

Opcionalmente, una secuencia conectora puede preceder a la secuencia de la etiqueta genética y/o separar uno o más dominios funcionales (por ejemplo, péptido para mejorar la expresión superficial, etiqueta genética, dominio transmembrana) de la etiqueta genética. Las secuencias conectoras son opcionalmente escindibles, por ejemplo, secuencias T2A (como se muestra en la Tabla 1) o secuencias IRES. Las secuencias conectoras escindibles se colocan normalmente para preceder a la secuencia genética de la etiqueta en un constructo de ácido nucleico. Otras secuencias conectoras son normalmente péptidos cortos, de aproximadamente 2 a 15 aminoácidos y se localizan entre dominios funcionales de la etiqueta genética incluyendo el péptido para mejorar expresión superficial, etiqueta genética y dominio transmembrana. En algunas alternativas, los conectores tienen entre 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos y están ubicados entre dominios funcionales de la etiqueta genética incluyendo el péptido para mejorar expresión superficial, etiqueta genética y dominio transmembrana. En algunas alternativas, el conector es un conector escindible. En algunas alternativas, el conector es una secuencia T2A escindible. En algunas alternativas, el conector incluye secuencias IRES.

En algunas alternativas, el sistema comprende además una o más etiquetas genéticas adicionales. En una alternativa de acuerdo con la divulgación, la secuencia de etiqueta genética adicional es un fragmento de una secuencia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFRt). En la Tabla 7 se proporciona un ejemplo de tal secuencia. Normalmente, una secuencia de etiqueta genética tiene una característica funcional que permite selección de células transducidas y/o detección de células transducidas. En algunas alternativas, la secuencia de etiqueta genética es compatible con transducción de linfocitos humanos.

En otras alternativas, una etiqueta genética adicional es un marcador seleccionable positivo. Una etiqueta genética seleccionable positiva puede ser un gen, que al ser introducido en la célula hospedadora, expresa un fenotipo dominante que permite la selección positiva de células portadoras del gen. En la técnica se conocen genes de este tipo e incluyen, entre otros, el gen de la higromicina-B fosfotransferasa (hph) que confiere resistencia a higromicina B, el gen de la aminoglicósido fosfotransferasa (neo o aph) de Tn5 que codifica la resistencia al antibiótico. G418, el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) que proporciona resistencia a metotrexato, DHFR dm, el gen pac que proporciona resistencia a puomicina, el gen Sh ble que inactiva la zeocina, el gen de la adenosina desaminasa (ADA) y el gen de resistencia a múltiples fármacos (MDR). Las células transducidas cultivadas en presencia de estos agentes sobrevivirán y se seleccionarán. En algunas alternativas, las células hospedadoras son linfocitos T precursores. En algunas alternativas, las células hospedadoras son células madre hematopoyéticas.

En una alternativa, un primer ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica una secuencia de etiqueta genética. En algunas alternativas, la secuencia de etiqueta genética es una secuencia de Her2t. En la Tabla 6 se muestra un ejemplo de polinucleótido y aminoácido para las secuencias de Her2t y se proporcionan por SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15, respectivamente. En una alternativa de acuerdo con la divulgación, la secuencia de etiqueta genética es un fragmento del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFRt) como se muestra en la Tabla 7. Un polinucleótido a modo de ejemplo para el receptor del factor de crecimiento epidérmico truncado es SEQ ID NO: 22.

Un polinucleótido que codifica una etiqueta genética puede prepararse fácilmente mediante métodos sintéticos o recombinantes a partir de la secuencia de aminoácidos. En algunas alternativas, un polinucleótido que codifica una secuencia de etiqueta genética está unido operativamente a un polinucleótido que codifica una secuencia conectora. En algunas alternativas, el polinucleótido que codifica una secuencia de etiqueta genética también puede tener uno o más sitios de enzimas de restricción en los extremos 5' y/o 3' de la secuencia codificante para facilitar la escisión y sustitución del polinucleótido que codifica una secuencia de etiqueta con otro polinucleótido que codifica una secuencia de etiqueta genética diferente. En algunas alternativas, el polinucleótido que codifica una secuencia marcadora es un codón optimizado para expresión en células de mamíferos, preferentemente seres humanos.

En algunas alternativas, se pueden emplear dos o más secuencias de etiqueta genética. En algunas alternativas, una primera secuencia de etiqueta genética está unida operativamente a un primer receptor antigénico quimérico y proporciona una indicación de que la célula transducida está expresando el primer CAR. En otras alternativas, una segunda secuencia de etiqueta genética está unida operativamente a un segundo CAR diferente y proporciona una indicación de que la célula transducida está expresando el segundo CAR.

Ácidos nucleicos y vectores

Otro aspecto de la divulgación incluye constructos de ácido nucleico y variantes de los mismos que codifican las etiquetas genéticas como se describe en el presente documento.

En algunas alternativas, un ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos de un fragmento de Her2 o una variante del mismo. En una alternativa específica, un ácido nucleico codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18. En una alternativa específica, un ácido nucleico codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15. En una alternativa de acuerdo con la divulgación, la secuencia de etiqueta genética es un fragmento del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFRt) como se muestra en la Tabla 7. Un polinucleótido a modo de ejemplo para el receptor del factor de crecimiento epidérmico truncado es SEQ ID NO: 21. Los ácidos nucleicos incluyen secuencias de ácidos nucleicos que están optimizadas por codón para expresión en seres humanos, secuencias de generadas, y secuencias variantes.

Vectores

En algunas alternativas, un vector comprende un ácido nucleico que codifica una etiqueta genética. Un ácido nucleico que codifica una etiqueta genética puede empaquetarse en un vector como un constructo separado o unirse a un ácido nucleico que codifica un transgén. En algunas alternativas, un ácido nucleico que codifica una etiqueta genética se empaqueta en un vector como un constructo separado o se une a un ácido nucleico que codifica un transgén.

Una diversidad de combinaciones de vectores se puede construir para proporcionar eficacia de transducción y expresión transgénica. En algunas alternativas, el vector es un vector viral empaquetado doble o único (todo en uno). En otras alternativas, los vectores pueden incluir una combinación de vectores virales y vectores plasmídicos. Otros vectores virales incluyen virus espumosos, vectores adenovirales, vectores retrovirales y vectores lentivirales. En alternativas, el vector es un vector lentiviral.

En algunas alternativas, un vector plasmídico o un vector viral comprende un ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica una etiqueta genética. En algunas alternativas, la etiqueta genética comprende un polinucleótido que codifica Her2t, y además comprende un promotor, un polinucleótido que codifica un péptido para mejorar la expresión superficial y/o un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana. En una alternativa específica, el primer ácido nucleico codifica un polipéptido que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 20 o SEQ ID NO: 15 o una variante del mismo unido operativamente a un promotor.

En algunas alternativas, un vector plasmídico o viral comprende un promotor unido operativamente a un polinucleótido que codifica un receptor antigénico quimérico unido operativamente a un polinucleótido que codifica una etiqueta genética. En algunas alternativas, el receptor antigénico quimérico está dirigido a CD19 o CD19 o CD20 y la etiqueta genética comprende el fragmento de Her2t. En algunas alternativas, el polinucleótido que codifica el CAR está unido operativamente a la etiqueta genética con un conector autoescindible. En otras alternativas, un vector plasmídico o viral comprende un promotor unido operativamente a un polinucleótido que codifica un receptor antigénico quimérico CD19 unido operativamente a un polinucleótido que codifica Her2t o EGFRt. En otras alternativas, un vector plasmídico o viral comprende un promotor unido operativamente a un polinucleótido que codifica un receptor antigénico quimérico CD20 unido operativamente a un polinucleótido que codifica Her2t o EGFRt.

Cada elemento del ácido nucleico puede separarse del otro con una secuencia conectora, preferentemente, un conector de autoescisión tal como una secuencia de autoescisión de T2A.

En otras alternativas, la secuencia de ácidos nucleicos heterogénea (heterogénea para el vector, por ejemplo, vector lentiviral) está limitada por la cantidad de componentes genéticos adicionales que pueden empaquetarse en el vector. En algunas alternativas, un constructo contiene al menos dos genes heterogéneos para el vector viral. En algunas alternativas, el constructo no contiene más de 4 genes heterogéneos para el vector viral. El número de genes heterogéneos para el vector viral que pueden empaquetarse en el vector puede determinarse detectando la expresión de uno o más transgenes y seleccionando constructo de lector que proporcionen la transducción de al menos un 10 % de las células y/o niveles de expresión detectables del transgén en al menos un 10 % de las células.

En algunas alternativas, un lentivirus es un virus empaquetado doble. Un virus empaquetado doble contiene al menos un ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica un receptor antigénico quimérico y una primera etiqueta genética. Opcionalmente, el ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica una citoquina y/o un receptor de quimioquina. Un virus empaquetado doble contiene al menos un ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica un receptor antigénico quimérico y una segunda etiqueta genética. Opcionalmente, el ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica una citoquina y/o un receptor de quimioquina. En algunas alternativas de un sistema con dos constructos, cada constructo puede empaquetarse en un vector viral separado y los vectores virales pueden mezclarse para transducción en una población celular. En algunas alternativas, la primera y la segunda etiqueta genéticas son diferentes entre sí.

En algunas alternativas, el virus empaquetado doble proporciona la expresión de al menos dos transgenes diferentes (por ejemplo, constructos de CAR) en un solo tipo de célula. El uso de diferentes etiquetas genéticas proporciona selección de células de doble transducción. En una alternativa específica, un vector plasmídico o viral comprende un promotor unido operativamente a un polinucleótido que codifica un receptor antigénico quimérico CD19 unido operativamente a un polinucleótido que codifica Her2t. En otras alternativas, el vector plasmídico o viral comprende además un promotor unido operativamente a un polinucleótido que codifica un receptor antigénico quimérico CD20 unido operativamente a un polinucleótido que codifica EGFRt.

En algunas alternativas, el vector es un minicírculo. Los minicírculos son vectores de ADN episomales que se producen como casetes de expresión circulares desprovistos de cualquier cadena principal de ADN plasmídico bacteriano. Su tamaño molecular más pequeño permite transfecciones más eficaces y ofrece una expresión sostenida durante un periodo de semanas en comparación con los vectores plasmídicos estándar que solo funcionan durante varios días. En algunas alternativas, un minicírculo comprende un promotor unido a un polinucleótido que codifica un receptor antigénico quimérico unido operativamente a una etiqueta genética. Pueden emplearse uno o más minicírculos. En algunas alternativas, un minicírculo comprende un promotor unido a un polinucleótido que codifica un receptor antigénico quimérico y una primera etiqueta genética, otro minicírculo comprende un promotor unido a un polinucleótido que codifica un receptor antigénico quimérico y una segunda etiqueta genética diferente. En algunas alternativas, cada elemento de los constructos está separado por un ácido nucleico, tal como uno que codifica una secuencia de T2A de autoescisión. En algunas alternativas, cada minicírculo difiere de otro en el receptor antigénico quimérico que incluye, pero no se limita a, la longitud y secuencia del espaciador, el dominio de señalización intracelular y/o la secuencia de etiqueta genética.

En algunas alternativas, el vector es un transposón PiggyBac. El transposón PiggyBac (PB) es un elemento genético móvil que se transpone eficazmente entre vectores y cromosomas mediante un mecanismo de "cortar y pegar". Durante la transposición, la transposasa PB reconoce secuencias de repetición terminal invertida (ITR) específicas de transposón ubicadas en ambos extremos del vector de transposón y mueve eficazmente los contenidos de los sitios originales y los integra eficazmente en los sitios cromosómicos TTAA. La potente actividad del sistema de transposones PiggyBac permite que los genes de interés entre las dos ITR en el vector PB se movilicen fácilmente en genomas diana.

En algunas alternativas, un PB contiene un promotor unido a un polinucleótido que codifica un receptor antigénico quimérico unido operativamente a una etiqueta genética. Se puede usar uno o más transposones PB. En algunas alternativas, un PB comprende un promotor unido a un polinucleótido que codifica un receptor antigénico quimérico y una primera etiqueta genética, otro PB comprende un promotor unido a un polinucleótido que codifica un receptor antigénico quimérico, y una segunda etiqueta genética diferente. Cada elemento de los constructos está separado por un ácido nucleico, como el que codifica una secuencia de T2A autoescindible. En algunas alternativas, cada PB difiere de otro en el receptor antigénico quimérico que incluye, pero no se limita a, la longitud y secuencia del espaciador, el dominio de señalización intracelular y/o la secuencia de etiqueta genética.

En algunas alternativas, un primer ácido nucleico comprende un primer promotor unido operativamente a un polinucleótido que codifica receptor antigénico quimérico que comprende un dominio de unión a ligando, en donde el dominio de unión a ligando se une a un ligando, en donde el ligando es una molécula específica de tumor, molécula viral, o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana que sea adecuada para mediar en el reconocimiento y eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en donde el espaciador proporciona una mayor proliferación de linfocitos T y/o producción de citoquinas como respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además una etiqueta genética.

En algunas alternativas, un segundo ácido nucleico comprende un polinucleótido que codifica un segundo y diferente receptor antigénico quimérico. El primer y segundo receptores antigénicos quiméricos pueden diferir entre sí en el dominio de unión a ligando, el antígeno diana, un epítipo del antígeno diana, el dominio espaciador en longitud y secuencia (corto, medio o largo) y en los dominios de señalización intracelular. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además una segunda etiqueta genética diferente a la del primer ácido nucleico.

En algunas alternativas, en un solo constructo de lentivirus, el primer y segundo ácidos nucleicos pueden separarse mediante un ácido nucleico aislante genómico tal, el dominio de cromatina aislante de erizo de mar.

En algunas alternativas, los promotores usados en el presente documento pueden ser promotores inducibles o constitutivos. Los promotores inducibles incluyen un promotor inducible por tamoxifeno, un promotor inducible por tetraciclina y un promotor inducible por doxociclina (por ejemplo, tre). Los promotores constitutivos incluyen SV40, CMV, UBC, EF1alfa, PGK y CAGG

Uno o más de estos vectores pueden usarse junto con otros para transducir células diana y proporcionar expresión de un receptor antigénico quimérico.

Transgenes

También son aspectos de la invención varios transgenes.

- 5 Las etiquetas genéticas, como se describe en el presente documento, son útiles para selección, rastreo y destrucción de células transducidas con un transgén y que lo expresan. Las etiquetas genéticas pueden utilizarse con cualquier número de transgenes diferentes. En la presente divulgación, a modo de ejemplo se usan transgenes de receptor antigénico quimérico, pero se aplican principios similares al diseño, identificación y selección de otros transgenes expresados en células transducidas.

10

Receptores de antígenos quiméricos

En las alternativas descritas en el presente documento pueden utilizarse varios receptores antigénicos quiméricos.

- 15 Un sistema para expresión de receptor antigénico quimérico comprende: un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor unido a un polinucleótido que codifica un receptor antigénico quimérico, el receptor antigénico quimérico que comprende un dominio de unión a ligando, en donde el ligando es una molécula específica de tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana que sea adecuada para mediar en el reconocimiento y eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en donde el espaciador proporciona una mayor proliferación de linfocitos T y/o producción de citoquinas como respuesta al
20 ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular. En otras alternativas, otro polinucleótido que codifica un receptor antigénico quimérico está bajo el control de un promotor constitutivo.

Dominio de unión a ligando

En las alternativas descritas en el presente documento pueden utilizarse muchos dominios de unión a ligando.

- En algunas alternativas, el ácido nucleico del receptor quimérico comprende un polinucleótido que codifica un dominio de unión a ligando. En algunas alternativas, el dominio de unión a ligando se une específicamente a un antígeno específico tumoral o viral. En algunas alternativas, un dominio de unión a ligando incluye, sin limitación, receptores o porciones de los mismos, péptidos pequeños, peptidomiméticos, sustratos, citoquinas y similares. En algunas alternativas, el dominio de unión a ligando es un anticuerpo o fragmento del mismo. Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede determinarse fácilmente. En una alternativa específica,
30 el polinucleótido codifica un Fv monocatenario que se une específicamente a CD19. En otras alternativas específicas, el polinucleótido codifica un Fv monocatenario que se une específicamente a CD20, HER2, CE7, hB7H3 o EGFR. Los expertos en la materia conocen las secuencias de estos anticuerpos o pueden determinarlas fácilmente.

- Los antígenos tumorales son proteínas producidas por células tumorales que provocan una respuesta inmunitaria. La selección del dominio de unión a ligando de la divulgación dependerá del tipo de cáncer a tratar y puede dirigirse a antígenos tumorales u otras moléculas de superficie de la célula tumoral. Una muestra de tumor de un sujeto puede caracterizarse por la presencia de ciertos biomarcadores o marcadores de superficie celular. Por ejemplo, las células de cáncer de mama de un sujeto pueden ser positivas o negativas para cada uno de Her2Neu, receptor de estrógenos y/o receptor de progesterona. Se selecciona un antígeno tumoral o una molécula de superficie celular que se encuentra
40 en las células tumorales del sujeto individual. Los antígenos tumorales y las moléculas de superficie celular se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno prostático específico, PSMA, Her2/neu, receptor de estrógenos, receptor de progesterona, efrinaB2, CD19, CD171, EGFR, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, CE7, hB7H3, ROR1, mesotelina, c-Met, GD-2, y/o MAGE A3 TCR. En algunas alternativas una molécula diana es una molécula de superficie celular que se encuentra en células tumorales y no se encuentra sustancialmente en tejidos normales, o restringida en su expresión en tejidos normales no vitales.

- En una alternativa, la molécula diana en el tumor comprende uno o más epítomos asociados a un tumor maligno. Los tumores malignos expresan una serie de proteínas que pueden servir como antígenos diana para el reconocimiento mediado por receptor de linfocitos T o receptor quimérico. Otras moléculas diana pertenecen al grupo de moléculas relacionadas con transformación celular, tales como CD19 o CD20. En algunas alternativas, el antígeno tumoral se expresa o sobreexpresa selectivamente en las células tumorales en comparación con las células de control del mismo tipo tisular. En otras alternativas, el antígeno tumoral es un polipéptido de superficie celular.

- Una vez identificada una molécula de superficie de la célula tumoral que podría ser diana con un receptor quimérico, se selecciona y caracteriza un epítipo de la molécula diana. Los anticuerpos que se unen específicamente a una molécula de superficie de la célula tumoral pueden prepararse usando métodos para obtener anticuerpos monoclonales, métodos de presentación de fagos, métodos para generar anticuerpos humanos o humanizados, o métodos que usan un animal o planta transgénico diseñado para producir anticuerpos humanos. También hay disponibilidad de bibliotecas de presentación de fagos de anticuerpos parcial o totalmente sintéticos y pueden
60 identificarse en busca de un anticuerpo o fragmento del mismo que pueda unirse a la molécula diana. También hay disponibilidad de bibliotecas de presentación de fagos de anticuerpos humanos. En algunas alternativas, los

anticuerpos se unen específicamente a una molécula de superficie de la célula tumoral y no reaccionan de forma cruzada con componentes inespecíficos tales como albúmina de suero bovino u otros antígenos no relacionados. Una vez identificada, la secuencia de aminoácidos o la secuencia de polinucleótidos que codifica el anticuerpo pueden aislarse y/o determinarse. En algunas alternativas, las bibliotecas de presentación en fagos de anticuerpos parcial o totalmente sintéticos se seleccionan para detectar un anticuerpo o fragmento del mismo que pueda unirse a una molécula diana.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno incluyen todos o una porción de anticuerpos policlonales, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo sintético, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo biespecífico, un minicuerpo y un anticuerpo lineal. Los fragmentos de anticuerpo comprenden una porción de un anticuerpo intacto, preferentemente la región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto y pueden prepararse fácilmente. Algunos ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos monocatenarios y anticuerpos multispecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

En algunas alternativas, varios anticuerpos diferentes que se unen a moléculas particulares de superficie de las células tumorales pueden aislarse y caracterizarse. En algunas alternativas, los anticuerpos se caracterizan en función de la especificidad del epítipo de la molécula diana. Además, en algunas alternativas, los anticuerpos que se unen al mismo epítipo pueden seleccionarse basándose en la afinidad del anticuerpo hacia ese epítipo. En algunas alternativas, un anticuerpo tiene una afinidad de al menos 1 mM, y preferentemente < 50 nM. En algunas alternativas, se selecciona un anticuerpo que tenga una mayor afinidad hacia el epítipo en comparación con otros anticuerpos. Por ejemplo, se selecciona un anticuerpo que tenga al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 40 veces o al menos 50 veces mayor afinidad que un anticuerpo de referencia que se une al mismo epítipo. En algunas alternativas, se selecciona un anticuerpo que tenga al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 40 veces, o al menos un 50 veces mayor afinidad que un anticuerpo de referencia que se une al mismo epítipo o cualquier valor de mayor afinidad entre cualquiera de los valores definidos enumerados.

En algunas alternativas, las moléculas diana se seleccionan entre CD19, CD20, CD22, CD23, CE7, hB7H3, EGFR, CD123, CS-1, ROR1, mesotelina, Her2, c-Met, PSMA, GD-2, y/o MAGE A3 TCR y combinaciones de los mismos. En algunas alternativas, cuando se desea un constructo de CAR de Her2, la etiqueta genética comprende un epítipo que no se une al scFv para Her2 usado en el constructo de CAR. En algunas alternativas, cuando se desea un constructo de CAR de EGFR, la etiqueta genética comprende un epítipo que no se une al scFv para EGFR usado en el constructo de CAR.

En alternativas específicas, el antígeno diana es CD19. Los expertos en la materia conocen una serie de anticuerpos específicos para CD19 y pueden caracterizarse fácilmente para secuencia, unión a epítipo y afinidad. En una alternativa específica, el constructo del receptor quimérico incluye una secuencia de scFV del anticuerpo FMC63. En otras alternativas, el scFV es un ScFv humano o humanizado que comprende una cadena ligera variable que comprende una secuencia de CDRL1 de RASQDISKYLN (SEQ ID NO: 27), secuencia de CDRL2 de SRLHSGV (SEQ ID NO: 28), y una secuencia de CDRL3 de GNTLPYTFG (SEQ ID NO: 29). En otras alternativas, el scFV es un ScFv humano o humanizado que comprende una cadena pesada variable que comprende la secuencia de CDRH1 de DYGVVS (SEQ ID NO: 30), secuencia de CDRH2 de VIWGSETTYNSALKS (SEQ ID NO: 31), y una secuencia de CDRH3 de YAMDY (SEQ ID NO: 32). La divulgación también contempla regiones variables que tienen al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la del scFv para FMC63 o un porcentaje de identidad de secuencia que esté entre un intervalo definido por cualesquiera dos de los porcentajes mencionados anteriormente y que tenga al menos la misma afinidad hacia CD 19.

En algunas alternativas, las regiones CDR se encuentran dentro de las regiones de anticuerpos numeradas por Kabat como sigue: para la cadena ligera; aminoácidos 24-34 de CDRL1; aminoácidos 50-56 de CDRL2; CDRL3 en los aminoácidos 89-97; para la cadena pesada en CDRH1 en los aminoácidos 31-35; CDRH2 en los aminoácidos 50-65; y para CDRH3 en los aminoácidos 95-102. Las regiones CDR en los anticuerpos pueden determinarse fácilmente.

En alternativas específicas, el antígeno diana es CD20. Los expertos en la materia conocen una serie de anticuerpos específicos para CD20 y pueden caracterizarse fácilmente para secuencia, unión a epítipo y afinidad. En una alternativa específica, el constructo de receptor quimérico incluye una secuencia scFV como se muestra en la Tabla 9. En otras alternativas, el scFV es un ScFv humano o humanizado que comprende una cadena ligera variable que comprende una secuencia de CDRL1 de R A S S S V N Y M D (SEQ ID NO: 33), secuencia de CDRL2 de CDRL2 A T S N L A S (SEQ ID NO: 34), y una secuencia de CDRL3 de Q Q W S F N P P T (SEQ ID NO: 35). En otras alternativas, el scFV es un ScFv humano o humanizado que comprende una cadena pesada variable que comprende la secuencia de CDRH1 de S Y N M H (SEQ ID NO: 36), CDRH2 de A I Y P G N G D T S Y N Q K F K G (SEQ ID NO: 37), y una secuencia de CDRH3 de S N Y Y G S S Y W F F D V (SEQ ID NO: 38). Las secuencias de CDR pueden determinarse fácilmente a partir de la secuencia de aminoácidos del scFv. La divulgación también contempla regiones variables que tienen al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la del scFv para CD20 o un porcentaje de identidad de secuencia que esté entre un intervalo definido por cualesquiera dos de los porcentajes mencionados anteriormente y que tenga al menos la misma afinidad hacia

CD20.

En algunas alternativas, un polinucleótido que codifica un dominio de unión a ligando está unido operativamente a un polinucleótido que codifica una región espaciadora. En algunas alternativas, el polinucleótido que codifica un dominio de unión a ligando también puede tener uno o más sitios de enzimas de restricción en los extremos 5' y/o 3' de la secuencia codificante para proporcionar escisión y reemplazo fáciles del polinucleótido con otro polinucleótido que codifica un dominio de unión a ligando que codifica un antígeno diferente o que tiene características de unión diferentes. Por ejemplo, un sitio de restricción, NheI, está codificado, cadena arriba de la secuencia líder; y un 3' RsrII situado dentro de la región bisagra permite la subclonación de cualquier scFv deseable en un vector de receptor quimérico. En algunas alternativas, el polinucleótido está optimizado por codón para expresión en células de mamífero. En algunas alternativas, el polinucleótido está optimizado por codón para expresión en células humanas.

En algunas alternativas, el polinucleótido que codifica un dominio de unión a ligando está unido operativamente a un péptido señal. En algunas alternativas, el péptido señal es un péptido señal para factor estimulador de colonias de granulocitos. Pueden utilizarse polinucleótidos que codifican otros péptidos señal tales como CD8 alfa.

En algunas alternativas, el polinucleótido que codifica un dominio de unión a ligando está unido operativamente a un promotor. Se selecciona un promotor que proporcione expresión del receptor antigénico quimérico en una célula de mamífero. En una alternativa específica, el promotor es un promotor inducible.

Una alternativa específica de un polinucleótido que codifica un dominio de unión a ligando se muestra en la Tabla 1 como el scFv de un anticuerpo que se une específicamente a CD19, tal como FMC63. Un polinucleótido que codifica un conector flexible que incluye los aminoácidos GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 39) separa las cadenas VH y VL en el scFV. La secuencia de aminoácidos del scFv que incluye el conector se muestra en la Tabla 1 (SEQ ID NO: 2). Se conocen otros anticuerpos dirigidos a CD19 tales como SJ25C1 y HD37. (SJ25C1: Bejcek *et al.* Cancer Res 2005, PMID 7538901; HD37: Pezutto *et al.* JI 1987, PMID 2437199).

Una alternativa específica de un polinucleótido que codifica un dominio de unión a ligando se muestra en la Tabla 9 como el scFv de un anticuerpo que se une específicamente a CD20. Un polinucleótido que codifica un conector flexible que incluye los aminoácidos GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 39) separa las cadenas VH y VL en el scFV. La secuencia de aminoácidos del scFv se muestra en la Tabla 9 (SEQ ID NO: 25). Se conocen otros anticuerpos dirigidos a CD20 tales como 1F5 (Budde *et al.* 2013, PLOS One).

Espaciador

En algunas alternativas, el ácido nucleico de receptor quimérico comprende un polinucleótido que codifica una región espaciadora. Normalmente una región espaciadora se encuentra entre el dominio de unión a ligando y el dominio transmembrana del receptor quimérico. En algunas alternativas, una región espaciadora proporciona flexibilidad del dominio de unión a ligando, permite niveles de expresión elevados en linfocitos. Un receptor quimérico específico de CD19 que tiene un dominio espaciador de aproximadamente 229 aminoácidos tenía menos actividad antitumoral que un receptor quimérico específico de CD19 con una región espaciadora corta constituida sólo por la bisagra de IgG4 modificada.

En algunas alternativas, una región espaciadora tiene al menos 10 a 229 aminoácidos, 10 a 200 aminoácidos, 10 a 175 aminoácidos, 10 a 150 aminoácidos, 10 a 125 aminoácidos, 10 a 100 aminoácidos, 10 a 75 aminoácidos, 10 a 50 aminoácidos, 10 a 40 aminoácidos, 10 a 30 aminoácidos, 10 a 20 aminoácidos, o 10 a 15 aminoácidos, o una longitud que esté dentro de un intervalo definido por cualesquiera dos de las longitudes de aminoácido mencionadas anteriormente. En algunas alternativas, una región espaciadora tiene 12 aminoácidos o menos pero más de 1 aminoácido, 119 aminoácidos o menos pero más de 1 aminoácido, o 229 aminoácidos o menos pero más de 1 aminoácido.

En algunas alternativas, la región espaciadora se deriva de una región bisagra de una molécula similar a inmunoglobulina. En algunas alternativas, una región espaciadora comprende toda o una porción de la región bisagra de una IgG1 humana, IgG2 humana, una IgG3 humana, o una IgG4 humana, y puede contener una o más sustituciones de aminoácido. En la Tabla 5 se proporcionan secuencias a modo de ejemplo de las regiones bisagra. En algunas alternativas, una porción de la región bisagra incluye los aminoácidos de la bisagra superior encontrados entre la cadena pesada variable y el núcleo, y los aminoácidos de bisagra núcleo que incluyen una región de poliprolina.

En algunas alternativas, las secuencias de región bisagra pueden modificarse en uno o más aminoácidos para evitar interacciones estructurales indeseadas tales como dimerización. En una alternativa específica, la región espaciadora comprende una porción de una región bisagra humana modificada de IgG4, por ejemplo, como se muestra en la Tabla 1 o en la Tabla 5 (SEQ ID NO: 10). Una representación de un polinucleótido que codifica una porción de una región bisagra de IgG4 modificada se proporciona en la Tabla 1. (SEQ ID NO: 1). En algunas alternativas, una región bisagra puede tener al menos aproximadamente un 90 %, 92 %, 95 %, o un 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de región bisagra identificada en la Tabla 1 o en la Tabla 5. En una alternativa específica, una porción de una región bisagra humana de IgG4 tiene una sustitución de aminoácido en los aminoácidos núcleo

de CPSP a CPPC.

En algunas alternativas, toda o una porción de la región bisagra se combina con uno o más dominios de una región constante de una inmunoglobulina. Por ejemplo, una porción de una región bisagra puede combinarse con toda o una porción de un dominio CH2 o CH3 o variante de los mismos. En algunas alternativas, la región espaciadora no incluye la secuencia de región bisagra de los aminoácidos 47-48 de CD8 alfa o la región espaciadora que comprende una porción extracelular de la molécula de CD28.

En algunas alternativas, una región espaciadora corta tiene aproximadamente 12 aminoácidos o menos pero más de 1 aminoácido y comprende toda o una porción de una secuencia de región bisagra de IgG4 o variante de la misma, una región espaciadora intermedia tiene aproximadamente 119 aminoácidos o menos pero más de 1 aminoácido y comprende toda o una porción de una secuencia de región bisagra de IgG4 y una región CH3 o variante de la misma, y un espaciador largo tiene aproximadamente 229 aminoácidos o menos pero más de 1 aminoácido y comprende toda o una porción de una secuencia de región bisagra de IgG4, una región CH2, y una región CH3 o variante de la misma.

Un polinucleótido que codifica una región espaciadora puede prepararse fácilmente mediante métodos sintéticos o recombinantes de la secuencia de aminoácidos. En algunas alternativas, un polinucleótido que codifica una región espaciadora está unido operativamente a un polinucleótido que codifica una región transmembrana. En algunas alternativas, el polinucleótido que codifica la región espaciadora también puede tener uno o más sitios de enzimas de restricción en los extremos 5' y/o 3' de la secuencia codificante para proporcionar escisión y reemplazo fáciles del polinucleótido con otro polinucleótido que codifica una región espaciadora diferente. En algunas alternativas, el polinucleótido que codifica la región espaciadora está optimizado por codón para expresión en células de mamífero. En algunas alternativas, el polinucleótido que codifica la región espaciadora está optimizado por codón para expresión en células humanas.

En una alternativa, la región espaciadora se selecciona entre una secuencia de región bisagra de IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4 o porción de las mismas, una secuencia de región bisagra de IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4 en combinación con toda o una porción de una región CH2 o variante de la misma, una secuencia de región bisagra de IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4 en combinación con toda o una porción de una región CH3 o variante de la misma, y una secuencia de región bisagra de IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4 en combinación con toda o una porción de una región CH2 o variante de la misma, y una región CH3 o variante de la misma. En algunas alternativas, una región espaciadora corta es una secuencia bisagra de IgG4 modificada (SEQ ID NO: 10) que tiene 12 aminoácidos o menos pero más de 1 aminoácido, una secuencia intermedia es una secuencia bisagra de IgG4 con una secuencia CH3 que tiene 119 aminoácidos o menos pero más de 1 aminoácido; o una secuencia bisagra de IgG4 con una región CH2 y CH3 que tiene 229 aminoácidos o menos pero más de 1 aminoácido. En algunas alternativas, una región espaciadora corta tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 aminoácidos o un tamaño dentro de un intervalo definido por cualesquiera dos de las longitudes de aminoácido mencionadas anteriormente. En algunas alternativas, una región espaciadora media tiene 13, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 o 119 aminoácidos o un tamaño dentro de un intervalo definido por cualesquiera dos de las longitudes de aminoácido mencionadas anteriormente. En algunas alternativas, una región espaciadora tiene 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210 o 219 aminoácidos o un tamaño dentro de un intervalo definido por cualesquiera dos de las longitudes de aminoácido mencionadas anteriormente.

Dominio transmembrana

En algunas alternativas, el ácido nucleico de receptor quimérico comprende un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana. El dominio transmembrana proporciona anclaje al receptor quimérico en la membrana. En algunas alternativas, el dominio transmembrana del receptor antigénico quimérico es diferente al de la etiqueta genética.

En una alternativa, se usa el dominio transmembrana que está asociado naturalmente con uno de los dominios en el receptor quimérico. En algunos casos, el dominio transmembrana puede seleccionarse o modificarse mediante sustitución de aminoácido para evitar la unión de tales dominios a los dominios transmembrana de la misma proteína de membrana de superficie, o diferentes, para minimizar interacciones con otros miembros del complejo de receptor.

El dominio transmembrana puede derivarse de una fuente natural o sintética. Cuando la fuente es natural, el dominio puede derivarse de cualquier proteína unida a membrana o transmembrana. Las regiones transmembrana comprenden al menos la región o regiones transmembrana de la cadena alfa, beta o zeta del receptor de linfocitos T, CD28, CD3, CD45, CD4, CD8, CD9, CD16, CD22; CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 y/o CD154. En una alternativa específica, el dominio transmembrana comprende la secuencia de aminoácidos del dominio transmembrana CD28 como se muestra en la Tabla 2. Una secuencia polinucleotídica representativa que codifica el dominio transmembrana CD28 se muestra en la Tabla 1 (dentro de la SEQ ID NO: 2).

Un dominio transmembrana puede ser sintético o una variante de un dominio transmembrana de origen natural. En algunas alternativas, los dominios transmembrana sintéticos o variantes comprenden predominantemente restos hidrófobos tales como leucina y valina. En algunas alternativas, un dominio transmembrana puede tener al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o un 100 % de identidad de secuencia con un dominio transmembrana como se muestra en la Tabla 2 o en la Tabla 6 o una identidad de secuencia que es un porcentaje dentro de un intervalo definido por

cualesquiera dos de los porcentajes mencionados anteriormente. Los dominios transmembrana variantes tienen preferentemente una puntuación hidrófoba de al menos 50 calculada mediante Kyte Doolittle.

Un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana puede prepararse fácilmente mediante métodos sintéticos o recombinantes. En algunas alternativas, un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana está unido operativamente a un polinucleótido que codifica una región de señalización intracelular. En algunas alternativas, el polinucleótido que codifica un dominio transmembrana también puede tener uno o más sitios de enzimas de restricción en los extremos 5' y/o 3' de la secuencia codificante para proporcionar escisión y reemplazo fáciles del polinucleótido que codifica un dominio transmembrana con otro polinucleótido que codifica un dominio transmembrana diferente. En algunas alternativas, el polinucleótido que codifica un dominio transmembrana está optimizado por codón para expresión en células de mamífero, preferentemente células humanas.

Dominio de señalización intracelular

En algunas alternativas, el ácido nucleico de receptor quimérico comprende un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular. El dominio de señalización intracelular proporciona activación de una función de la célula transducida que expresa el receptor quimérico al unirse al ligando expresado en células tumorales. En algunas alternativas, el dominio de señalización intracelular contiene uno o más dominios de señalización intracelular. En algunas alternativas, el dominio de señalización intracelular es una porción y/o una variante de un dominio de señalización intracelular que proporciona activación de al menos una función de la célula transducida.

Algunos ejemplos de dominios de señalización intracelular para uso en un receptor quimérico de la divulgación incluyen las secuencias citoplásmicas de la cadena zeta de CD3 y/o correceptores que actúan concertados para iniciar la transducción de señales después de la participación del receptor quimérico, así como cualquier derivado o variante de estas secuencias y cualquier secuencia sintética que tenga la misma capacidad funcional. Puede decirse que la activación de linfocitos T está mediada por dos clases distintas de secuencia de señalización citoplasmática: las que inician la activación primaria dependiente del antígeno y proporcionan una señal similar al receptor de linfocitos T (secuencias de señalización citoplasmática primaria) y las que actúan de manera independiente del antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora (secuencias de señalización citoplásmicas secundarias). Las secuencias de señalización citoplásmicas primarias que actúan de forma estimuladora pueden contener motivos de señalización que se conocen como motivos de activación basados en tirosina de receptor o ITAM. Los ejemplos de ITAM que contienen secuencias de señalización citoplásmicas primarias incluyen las derivadas de CD3 zeta, FcR gamma, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b y/o CD66d. En algunas alternativas, el dominio intracelular de señalización primaria puede tener al menos un 80 %, 85 %, 90 %, o un 95 % de identidad de secuencia con CD3zeta que tiene una secuencia proporcionada en la Tabla 4 o un porcentaje de identidad de secuencia que esté dentro de un intervalo definido por cualesquiera dos de los porcentajes mencionados anteriormente. En algunas alternativas, las variantes de CD3 zeta conservan al menos una, dos, tres o todas las regiones de ITAM como se muestra en la Tabla 4.

En una alternativa preferente, el dominio de señalización intracelular del receptor quimérico puede diseñarse para comprender el dominio de señalización CD3-zeta por sí mismo o combinado con cualquier otro dominio(s) citoplasmático(s) deseado(s). Por ejemplo, el dominio de señalización intracelular del receptor quimérico puede comprender una cadena CD3zeta y una región de señalización coestimuladora.

La región de señalización coestimuladora se refiere a una porción del receptor quimérico que comprende el dominio intracelular de una molécula coestimuladora. Una molécula coestimuladora es una molécula de superficie celular distinta de un receptor de antígeno o sus ligandos que se requiere para una respuesta de linfocitos a un antígeno. Algunos ejemplos de tales moléculas incluyen CD27, CD28, 4-1BB (CD 137), OX40, CD30, CD40, antígeno 1 asociado a función linfocitaria (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, proteína quinasa asociada a cadena zeta (ZAP70), y/o un ligando que se une específicamente a CD83. En algunas alternativas, el dominio de señalización coestimuladora puede tener al menos un 80 %, 85 %, 90 %, o un 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con el dominio intracelular de CD28 como se muestra en la Tabla 2 o con 4-1BB que tiene una secuencia proporcionada en la Tabla 3 o cualquier porcentaje de identidad de secuencia que esté dentro de un intervalo definido por cualesquiera dos de los porcentajes mencionados anteriormente. En una alternativa, una variante del dominio intracelular de CD28 comprende una sustitución de aminoácido en las posiciones 186-187, en donde LL está sustituido con GG.

Las secuencias de señalización intracelular del receptor quimérico pueden unirse entre sí en un orden aleatorio o especificado. Opcionalmente, un conector oligo o polipeptídico corto, con una longitud preferentemente entre 2 y 10 aminoácidos, puede formar la unión. En algunas alternativas, un conector oligo o polipeptídico corto comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos o un tamaño que esté dentro de un intervalo definido por cualesquiera dos de los tamaños mencionados anteriormente. En una alternativa, los dominios de señalización intracelular comprenden toda o una porción del dominio de señalización de CD3-zeta o una variante del mismo y toda o una porción del dominio de señalización de CD28 o una variante del mismo. En otra alternativa, el dominio de señalización intracelular comprende toda o una porción del dominio de señalización de CD3-zeta o variante del mismo y toda o una porción del dominio de señalización de 4-1BB o variante del mismo. Además en otra alternativa, el dominio de señalización intracelular comprende toda o una porción del dominio de señalización de CD3-zeta o variante del mismo, toda o una porción del

dominio de señalización de CD28 o variante del mismo, y toda o una porción del dominio de señalización de 4-1BB o variante del mismo. En una alternativa específica, la secuencia de aminoácidos del dominio de señalización intracelular que comprende una variante de CD3zeta y una porción del dominio de señalización intracelular de 4-1BB se proporciona en la Tabla 1. En la Tabla 1 se proporciona una secuencia de ácidos nucleicos representativa (dentro de SEQ ID NO: 2).

En una alternativa, un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular comprende un dominio intracelular de 4-1BB unido a una porción de un dominio CD3zeta. En otras alternativas, un dominio intracelular 4-1BB y un dominio intracelular CD28 están unidos a una porción de un dominio CD3 zeta.

Un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular puede prepararse fácilmente mediante métodos sintéticos o recombinantes de la secuencia de aminoácidos. En algunas alternativas, el polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular también puede tener uno o más sitios de enzimas de restricción en los extremos 5' y/o 3' de la secuencia codificante para proporcionar escisión y reemplazo fáciles del polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular con otro polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular diferente. En algunas alternativas, el polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular está optimizado por codón para expresión en células de mamífero. En algunas alternativas, el polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular está optimizado por codón para expresión en células humanas.

Dominios conectores

En algunas alternativas un dominio conector se proporciona para flexibilidad entre dominios en un constructo de CAR. Como se muestra a continuación, un conector (SEQ ID NO: 45) entre Dominio IV y el dominio transmembrana de Her2t condujo al constructo Her2tG. El conector se usa para inducir flexibilidad entre dominios proteicos. En otros ejemplos, el scFv de muchos CAR contiene cuatro subunidades G3S consecutivas colocadas entre los dominios Vh y VI del scFv del CAR. Esto permite flexibilidad en el plegamiento de los dos dominios scFv. En una alternativa a modo de ejemplo, lo lógico para usar dos subunidades conectoras G3S podría ser suficiente para poder inducir una mayor flexibilidad para Her2tG.

También se usaron dos subunidades conectoras G3S unidas como una (SEQ ID NO: 45) para imitar la longitud del espaciador de la bisagra de CD28 y la bisagra de IgG4. Tanto la bisagra de CD28 como la bisagra de IgG4 se han usado previamente como espaciadores entre el scFv y la región transmembrana en los CAR que son funcionales. Tanto la bisagra de CD28 como la bisagra de IgG4 contienen una cisteína que facilita la dimerización. Aunque es útil para los CAR, esta dimerización puede inhibir la flexibilidad de Her2t y, por lo tanto, no permitir un reconocimiento tan significativo de Herceptin. La ventaja de usar dos conectores G3S (SEQ ID NO: 45) de tres o cuatro fue limitar la carga útil del vector, eliminar secuencias potencialmente innecesarias y al mismo tiempo conseguir una funcionalidad mejorada.

En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, se proporciona un polipéptido aislado, en donde el polipéptido aislado al menos un 95 % de identidad de secuencia con un polipéptido de un dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 unido a un dominio transmembrana, en donde el polipéptido aislado se une específicamente a un anticuerpo que se une a un epítipo en el Dominio IV de Her2, y en donde el polipéptido aislado excluye al HER maduro de longitud completa, y en donde el dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 está unido al dominio transmembrana mediante una secuencia que comprende los aminoácidos GGGSGGGS (SEQ ID NO: 45). En algunas alternativas, el polipéptido HER2 comprende los aminoácidos ácido glutámico 580, ácido aspártico 582, ácido aspártico 592, fenilalanina 595, y glutamina 624 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el polipéptido HER2 comprende los aminoácidos 563-652 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el dominio transmembrana comprende los aminoácidos 653-675 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el polipéptido aislado comprende además un péptido líder que proporciona expresión en la superficie celular. En algunas alternativas, el péptido líder comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 17. En algunas alternativas, el anticuerpo es trastuzumab.

Células hospedadoras y composiciones: poblaciones de linfocitos T

De acuerdo con la divulgación, las composiciones descritas en el presente documento proporcionan células hospedadoras genéticamente modificadas con los vectores y/o constructos como se describe en el presente documento. En algunas alternativas, las células hospedadoras son linfocitos T CD4+ y/o CD8+. En algunas alternativas, las células hospedadoras son linfocitos T precursores. En algunas alternativas, las células hospedadoras son células madre hematopoyéticas.

Los linfocitos T pueden recolectarse de acuerdo con técnicas conocidas y pueden enriquecerse o empobrecerse mediante técnicas conocidas tales como unión por afinidad a anticuerpos tales como citometría de flujo y/o selección inmunomagnética. Después de las etapas de enriquecimiento y/o empobrecimiento, la expansión *in vitro* de los linfocitos T deseados puede realizarse de acuerdo con técnicas conocidas o variaciones de las mismas que serán evidentes para los expertos en la materia. En algunas alternativas, los linfocitos T son linfocitos T autólogos obtenidos

del paciente.

Por ejemplo, la población o subpoblación de linfocitos T deseada puede expandirse añadiendo una población de linfocitos T inicial a un medio de cultivo *in vitro* y a continuación añadiendo células alimentadoras al medio de cultivo, tales como células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que no se dividen, (por ejemplo, de modo que la población resultante de células contenga al menos 5, 10, 20 o 40 o más células alimentadoras PBMC o una cantidad que esté dentro de un intervalo definido por cualesquiera dos de las cantidades mencionadas anteriormente para cada linfocito T en la población a expandir); e incubar el cultivo (por ejemplo, durante un tiempo suficiente para expandir el número de linfocitos T). Las células alimentadoras que no se dividen pueden comprender células alimentadoras PBMC irradiadas con rayos gamma. En algunas alternativas, las PBMC se irradian con rayos gamma en el intervalo de 3000 a 3600 rads para evitar la división celular. En algunas alternativas, las PBMC se irradian con rayos gamma de 3000, 3100, 3200, 3300, 3400, 3500 o 3600 rads o cualquier valor de rads entre cualesquiera dos extremos de cualquiera de los valores enumerados para evitar la división celular. El orden de adición de los linfocitos T y las células alimentadoras al medio de cultivo puede invertirse si se desea. El cultivo normalmente puede incubarse en condiciones de temperatura y similares que sean adecuadas para el crecimiento de linfocitos T. Para el crecimiento de linfocitos T humanos, por ejemplo, la temperatura generalmente será de al menos 25 grados Celsius, preferentemente al menos 30 grados, más preferentemente aproximadamente 37 grados. En algunas alternativas, la temperatura para el crecimiento de linfocitos T humanos es 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 37 grados Celsius o cualquier otra temperatura entre cualesquiera dos extremos de cualquiera de los valores enumerados.

Los linfocitos T expandidos incluyen linfocitos T citotóxicos CD8⁺ (CTL) y linfocitos T auxiliares CD4⁺ que pueden ser específicos para un antígeno presente en un tumor humano o un patógeno.

Opcionalmente, el método de expansión puede comprender además la etapa de añadir células linfoblastoides (LCL) transformadas con EBV que no se dividen como células alimentadoras. Las LCL pueden irradiarse con rayos gamma en el intervalo de 6000 a 10.000 rads. En algunas alternativas, las LCL se irradian con rayos gamma de 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, 9500 o 10.000 rads o cualquier valor de rads entre dos extremos de cualquiera de los valores enumerados. Las células alimentadoras LCL pueden proporcionarse en cualquier cantidad adecuada, tal como una relación de células alimentadoras LCL con respecto a linfocitos T iniciales de al menos aproximadamente 10:1.

Opcionalmente, el método de expansión puede comprender además la etapa de añadir anticuerpo anti-CD3 y/o anti-CD28 al medio de cultivo (por ejemplo, a una concentración de al menos aproximadamente 0,5 ng/ml). Opcionalmente, el método de expansión puede comprender además la etapa de añadir IL-2 y/o IL-15 al medio de cultivo (por ejemplo, en donde la concentración de IL-2 es de al menos aproximadamente 10 unidades/ml).

Después de aislar los linfocitos T, tanto citotóxicos como auxiliares, los linfocitos T pueden clasificarse en subpoblaciones de linfocitos T sin activación previa, de memoria y efectores, ya sea antes o después de la expansión.

Los linfocitos CD8⁺ pueden obtenerse usando métodos estándar. En algunas alternativas, los linfocitos CD8⁺ se clasifican además en linfocitos sin activación previa, de memoria central y de memoria efectora mediante la identificación de antígenos de la superficie celular que están asociados a cada uno de esos tipos de linfocitos CD8⁺. En algunas alternativas, los linfocitos T de memoria están presentes en los subconjuntos CD62L⁺ y CD62L⁻ de los linfocitos CD8⁺ de sangre periférica. Las PBMC se clasifican en fracciones CD62L-CD8⁺ y CD62L⁺CD8⁺ después de tinción con anticuerpos anti-CD8 y anti-CD62L. En algunas alternativas, la expresión de marcadores fenotípicos de T_{CM} de memoria central incluye CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 y CD127 y son negativos o bajos para granzima B. En algunas alternativas, los linfocitos T de memoria central son linfocitos T CD45RO⁺, CD62L⁺, CD8⁺. En algunas alternativas, los T_E efectores son negativos para CD62L, CCR7, CD28 y CD127, y positivos para granzima B y perforina. En algunas alternativas, sin activación los linfocitos T CD8⁺ sin activación previa se caracterizan por la expresión de marcadores fenotípicos de linfocitos T sin activación previa, incluyendo CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD127 y CD45RA.

Los linfocitos CD4⁺ auxiliares se clasifican en linfocitos sin activación previa, de memoria central, y efectores mediante la identificación de poblaciones de células que tienen antígenos de superficie celular. Los linfocitos CD4⁺ pueden obtenerse mediante métodos estándar. En algunas alternativas, los linfocitos T CD4⁺ sin activación previa son linfocitos T CD45RO⁻, CD45RA⁺, CD62L⁺, CD4⁺. En algunas alternativas, los linfocitos CD4⁺ de memoria central son CD62L⁺ y CD45RO⁺. En algunas alternativas, los linfocitos CD4⁺ efectores son CD62L⁻ y CD45RO⁻.

Si una célula o población celular es positiva para un marcador de superficie celular en particular puede determinarse mediante citometría de flujo usando tinción con un anticuerpo específico para el marcador de superficie y un anticuerpo de control de isotipo emparejado. Una población celular negativa para un marcador se refiere a la ausencia de tinción significativa de la población celular con el anticuerpo específico por encima del control de isotipo, positiva se refiere a la tinción uniforme de la población celular por encima del control de isotipo. En algunas alternativas, una disminución de la expresión de uno de los marcadores se refiere a la pérdida de 1 log₁₀ de la intensidad media de fluorescencia y/o disminución del porcentaje de células que exhiben el marcador de al menos un 20 % de las células, 25 % de las células, 30 % de las células, 35 % de las células, 40 % de las células, 45 % de las células, 50 % de las células, 55 % de las células, 60 % de las células, 65 % de las células, 70 % de las células, 75 % de las células, 80 % de las células,

85 % de las células, 90 % de las células, 95 % de las células, y un 100 % de las células y cualquier % entre un 20 y un 100 % cuando se compara con una población celular de referencia o cualquier intervalo de porcentaje de células entre los valores porcentuales de cualquiera de los valores mencionados anteriormente cuando se compara con una población celular de referencia. En algunas alternativas, una población celular positiva para uno de los marcadores se refiere a un porcentaje de células que exhiben el marcador de al menos un 50 % de las células, 55 % de las células, 60 % de las células, 65 % de las células, 70 % de las células, 75 % de las células, 80 % de las células, 85 % de las células, 90 % de las células, 95 % de las células, y un 100 % de las células y cualquier porcentaje dentro de un intervalo definido por cualesquiera dos de los porcentajes mencionados anteriormente cuando se compara con una población celular de referencia.

En algunas alternativas, pueden obtenerse poblaciones de CD4+ y CD8+ que son específicas de antígeno estimulando linfocitos T sin activación previa o específicos de antígeno con antígeno. Por ejemplo, pueden generarse líneas o clones de linfocitos T específicos de antígeno para antígenos de citomegalovirus aislando linfocitos T de sujetos infectados y estimulando las células *in vitro* con el mismo antígeno. También pueden usarse linfocitos T sin activación previa. Cualquier número de antígenos de células tumorales puede usarse como dianas para provocar respuestas de linfocitos T. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, las composiciones de inmunoterapia celular adoptiva son útiles en el tratamiento de una enfermedad o trastorno que incluye un tumor sólido, neoplasia hematológica, cáncer de mama o melanoma.

Modificación de poblaciones de linfocitos T

En algunas alternativas, puede desearse introducir genes funcionales en los linfocitos T a usar en inmunoterapia de acuerdo con la presente divulgación. Por ejemplo, el gen o genes introducidos pueden mejorar la eficacia de la terapia promoviendo la viabilidad y/o función de los linfocitos T transferidos; o pueden proporcionar un marcador genético para permitir la selección y/o evaluación de la supervivencia o migración *in vivo*; o pueden incorporar funciones que mejoran la seguridad de la inmunoterapia, por ejemplo, haciendo que la célula sea susceptible de expresión controlada del transgén. Esto puede realizarse de acuerdo con técnicas conocidas que serán evidentes para los expertos en la materia basándose en la presente divulgación.

En algunas alternativas, los linfocitos T se modifican con un vector que codifica etiquetas genéticas como se describe en el presente documento. En algunas alternativas, las células se modifican con un vector que comprende un polinucleótido que codifica un receptor antigénico quimérico unido operativamente a una etiqueta genética. En otras alternativas, las células se modifican con un vector que comprende un polinucleótido que codifica solo una etiqueta genética. En algunas alternativas, los linfocitos T se obtienen del sujeto a tratar, en otras alternativas, los linfocitos se obtienen de donantes humanos alogénicos, preferentemente donantes humanos sanos.

Los receptores quiméricos pueden construirse con una especificidad para cualquier marcador de superficie celular utilizando fragmentos de unión a antígeno o dominios variables de anticuerpo de, por ejemplo, moléculas de anticuerpo. Las moléculas de unión a antígeno pueden unirse a uno o más módulos de señalización celular. En algunas alternativas, los módulos de señalización celular incluyen dominio transmembrana CD3, dominios de señalización intracelular CD3 y dominios transmembrana CD28. En algunas alternativas, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio transmembrana y de señalización CD28 unido a un dominio intracelular CD3 zeta.

En algunas alternativas, el mismo receptor quimérico o uno diferente puede introducirse en cada una de las poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+. En algunas alternativas, el receptor quimérico en cada una de estas poblaciones tiene un dominio de unión a ligando que se une específicamente al mismo ligando en el tumor o célula infectada o un antígeno o epítipo diferente. Los módulos de señalización celular pueden diferir. En algunas alternativas, el dominio de señalización intracelular de los linfocitos T citotóxicos CD8+ es el mismo que el dominio de señalización intracelular de los linfocitos T auxiliares CD4+. En otras alternativas, el dominio de señalización intracelular de los linfocitos T citotóxicos CD8+ es diferente al dominio de señalización intracelular de los linfocitos T auxiliares CD4+. Cada receptor quimérico está unido operativamente a una etiqueta genética diferente que permite selección e identificación de células transducidas que expresan ambos receptores antigénicos quiméricos.

De acuerdo con la divulgación, algunas alternativas incluyen métodos para fabricar composiciones que comprenden células hospedadoras como se describe en el presente documento. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, un método comprende introducir un ácido nucleico aislado, tal como un ácido nucleico que codifica polipéptido aislado que comprende al menos un 95 % de identidad de secuencia con un polipéptido de un dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 511 a 652 o 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 unido a un dominio transmembrana, en donde el polipéptido aislado se une específicamente a un anticuerpo que se une a un epítipo en el Dominio IV de Her2, en una célula hospedadora; y cultivar las células hospedadoras en un medio que comprende al menos un factor de crecimiento. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, un método comprende además seleccionar las células hospedadoras para expresión de Her2t antes o después o tanto antes como después de la etapa de cultivo. En otras alternativas de acuerdo con la divulgación, un método de fabricación comprende además introducir un segundo ácido nucleico que codifica un segundo receptor antigénico quimérico y una segunda etiqueta genética en la célula hospedadora. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, el método comprende además seleccionar las células hospedadoras para expresión de la segunda

etiqueta genética antes o después o tanto antes como después de la etapa de cultivo. En algunas alternativas, las células hospedadoras son linfocitos T precursores. En algunas alternativas, las células hospedadoras son células madre hematopoyéticas.

En otras alternativas de acuerdo con la divulgación, un método comprende introducir un primer ácido nucleico aislado, tal como un ácido nucleico que codifica polipéptido aislado que comprende al menos un 95 % de identidad de secuencia con un polipéptido de un dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 511 a 652 o 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 unido a un dominio transmembrana, en donde el polipéptido aislado se une específicamente a un anticuerpo que se une a un epítipo en el Dominio IV de Her2, en una primera célula hospedadora; seleccionar primeras células hospedadoras que expresan Her2t, introducir un segundo ácido nucleico que codifica un segundo receptor antigénico quimérico y una segunda etiqueta genética en una segunda célula hospedadora, seleccionar segundas células hospedadoras para expresión de la segunda etiqueta genética, y opcionalmente, cultivar la primera y segunda células hospedadoras en un medio que comprende al menos un factor de crecimiento. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, una composición comprende una primera y segunda población de células hospedadoras. En algunas alternativas, las células hospedadoras son linfocitos T precursores. En algunas alternativas, las células hospedadoras son células madre hematopoyéticas.

En algunas alternativas, cada uno de los linfocitos T CD4 o CD8 puede clasificarse en linfocitos sin activación previa, de memoria central, de memoria efectora, o efectores antes de la transducción, como se describe en el presente documento. En algunas alternativas, cada uno de los linfocitos T CD4 o CD8 puede clasificarse en linfocitos sin activación previa, de memoria central, de memoria efectora, o efectores antes de la transducción.

Como se describe en el presente documento, en algunas alternativas, los linfocitos CD4+ sin activación previa son linfocitos T positivos para CD45RO-, CD45RA+, CD62L+ y/o CD4+. En algunas alternativas, los linfocitos CD4+ de memoria central son positivos para CD62L y/o positivos para CD45RO. En algunas alternativas, los linfocitos CD4+ efectores son negativos para CD62L y/o positivos para CD45RO. Cada una de estas poblaciones puede modificarse independientemente con un receptor quimérico.

Como se describe en el presente documento, en algunas alternativas, los linfocitos T de memoria están presentes en los subconjuntos CD62L+ y/o CD62L- de los linfocitos de sangre periférica CD8+. Las PBMC se clasifican en fracciones CD62L-CD8+ y/o CD62L+CD8+ después de tinción con anticuerpos anti-CD8 y anti-CD62L. En algunas alternativas, la expresión de marcadores fenotípicos de linfocitos T de memoria central (TCM) incluye CD62L, CCR7, CD28, CD3 y/o CD127 y son negativos o bajos para granzima B. En algunas alternativas, los linfocitos T de memoria central son linfocitos T CD45RO+, CD62L+, y/o CD8+. En algunas alternativas, los linfocitos T efectores (T_E) son negativos para CD62L, CCR7, CD28, y/o CD 127, y positivos para granzima B y/o perforina. En algunas alternativas, los linfocitos T CD8+ sin activación previa se caracterizan por CD8+, CD62L+, CD45RO+, CCR7+, CD28+ CD127+, y/o CD45RO+. Cada una de estas poblaciones puede modificarse independientemente con un receptor quimérico.

Se han desarrollado diversas técnicas de transducción que utilizan partículas de virus infecciosos recombinantes para suministro génico. Esto representa un enfoque actualmente preferente para la transducción de linfocitos T de la presente invención. Los vectores virales que se han usado de esta manera incluyen vectores de virus derivados del virus 40 de simio, adenovirus, virus adenoasociado (AAV), vectores lentivirales y retrovirus. Por lo tanto, los métodos de transferencia y expresión génica son numerosos pero funcionan esencialmente para introducir y expresar material genético en células de mamíferos. Varias de las técnicas anteriores se han usado para transducir células hematopoyéticas o linfoides, incluyendo transfección con fosfato cálcico, fusión de protoplastos, electroporación e infección con adenovirus recombinantes, virus adenoasociados y vectores retrovirales. Los linfocitos T primarios se han transducido satisfactoriamente mediante electroporación y mediante infección retroviral o lentiviral.

Los vectores retrovirales y lentivirales proporcionan un método muy eficaz para transferencia génica a células eucariotas. Además, la integración retroviral o lentiviral se produce de forma controlada y da como resultado la integración estable de una o unas pocas copias de la nueva información genética por célula. En algunas alternativas, se usan vectores retrovirales o lentivirales para transferencia génica a células eucariotas. En algunas alternativas, las células son células humanas.

Se contempla que la sobreexpresión de un factor estimulador (por ejemplo, una linfoquina o una citoquina) puede ser tóxica para el individuo tratado. Por lo tanto, dentro del alcance de la invención está incluir segmentos génicos que hacen que los linfocitos T de la invención sean susceptibles de selección negativa *in vivo*. Por "selección negativa" se entiende que la célula infundida puede eliminarse como resultado de un cambio en la condición *in vivo* del individuo. El fenotipo seleccionable negativo puede resultar de la inserción de un gen que confiere sensibilidad a un agente administrado, por ejemplo, un compuesto. En algunas alternativas, la etiqueta genética Her2t también proporciona selección negativa *in vivo*. Por ejemplo, si se deseara eliminar las células que expresan CAR con la etiqueta genética Her2t, se administra un anticuerpo que se une al Dominio IV de Her2 (por ejemplo, trastuzumab) o un anticuerpo que compite por unirse a un anticuerpo que se une al Dominio IV de Her2, al sujeto. En alternativas preferentes para eliminar las células transducidas los anticuerpos, los anticuerpos contienen una región Fc para activar la reacción de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos para destruir las células transducidas. En otras alternativas, el anticuerpo o fragmento del mismo está unido a un agente citotóxico. El conjugado citotóxico se une a células que

expresan CAR y her2t y las destruye. Este método proporciona una forma de extirpar células administradas que están asociadas a toxicidad o efectos secundarios adversos.

En la técnica se conocen otros genes seleccionables negativos e incluyen, entre otros, los siguientes: el gen de timidina quinasa de tipo I del virus del Herpes simple (HSV-I TK), que confiere sensibilidad a ganciclovir; el gen de la hipoxantina fosforribosiltransferasa celular (HPRT), el gen de la adenina fosforribosiltransferasa celular (APRT) y citosina desaminasa bacteriana.

Para transducir linfocitos T puede emplearse una diversidad de métodos, como se conoce bien en la técnica. En algunas alternativas, la transducción se realiza usando vectores lentivirales.

En algunas alternativas, los linfocitos CD4+ y CD8+ pueden modificarse cada uno por separado con un vector de expresión que codifica un receptor quimérico para formar poblaciones definidas. En algunas alternativas, las células pueden modificarse por separado con un vector que comprende un polinucleótido que codifica un CAR y una primera etiqueta genética y/o un vector que comprende un polinucleótido que codifica un CAR y una segunda y etiqueta genética diferente. En algunas alternativas, los constructos de CAR pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, los linfocitos T CD8 se transducen con un constructo de CAR que tiene la primera etiqueta genética y los linfocitos T CD4 se transducen con el mismo CAR con segunda etiqueta genética.

En algunas alternativas, estas células se clasifican a continuación en subpoblaciones de linfocitos sin activación previa, de memoria central, y efectores, como se describió anteriormente clasificando los antígenos de superficie celular únicos para cada una de esas poblaciones celulares. Además, las poblaciones de linfocitos CD4+ o CD8+ pueden seleccionarse por su perfil de citoquina o actividades proliferativas. Por ejemplo, pueden seleccionarse linfocitos T CD4+ que tienen producción mejorada de citoquinas tales como IL-2, IL-4, IL-10, TNF α , y/o IFN γ en comparación con células transducidas de forma simulada o linfocitos CD8+ transducidos cuando se estimulan con antígeno. En otras alternativas, se seleccionan linfocitos T CD4+ sin activación previa o de memoria central que tienen una producción mejorada de IL-2 y/o TNF α . Asimismo, los linfocitos CD8+ que tienen una producción mejorada de IFN γ se seleccionan en comparación con linfocitos CD8+ transducidos de forma simulada. En algunas alternativas, las poblaciones de linfocitos CD4+ o CD8+ se seleccionan por su perfil de citoquina o actividades proliferativas. En algunas alternativas, se seleccionan linfocitos T CD4+ que tienen producción mejorada de citoquinas tales como IL-2, IL-4, IL-10, TNF α y/o IFN γ en comparación con células transducidas de forma simulada o linfocitos CD8 + transducidos cuando se estimulan con antígeno.

En algunas alternativas, se seleccionan linfocitos CD4+ y CD8+ que son citotóxicos para células portadoras de antígenos. En algunas alternativas, se espera que los linfocitos CD4+ sean débilmente citotóxicos en comparación con los CD8+. En una alternativa preferente, se seleccionan linfocitos transducidos, tales como linfocitos CD8+ de memoria central, que proporcionen la muerte de células tumorales *in vivo* usando un modelo animal establecido para el tipo particular de cáncer.

Además en otras alternativas, las células transducidas se seleccionan para la expresión de una etiqueta genética. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, después de transducción, las células que expresan, por ejemplo, Her2t o EGFRt se seleccionan usando anticuerpos que se unen a las etiquetas genéticas. En algunas alternativas, los anticuerpos permiten la selección de la población celular que contiene al menos un 80-100 % de células positivas para la etiqueta genética.

Las células seleccionadas pueden evaluarse para expresión transgénica usando técnicas tales como transferencia de Western o citometría de flujo. En algunas alternativas, las células seleccionadas para expresión de una etiqueta genética también se caracterizan además para expresión del CAR analizando, por ejemplo, la cantidad de dominio estimulador (por ejemplo, CD3zeta), proteína L y T2A. En algunas alternativas, se seleccionan células que tienen una relación de aproximadamente 1:0,1 a 10:0,1 de expresión del CAR con respecto a la etiqueta genética. En algunas alternativas, se seleccionan células que tienen una relación de aproximadamente 1:0,1, 2:0,1, 3:0,1, 4:0,1, 5:0,1, 6:0,1, 7:0,1, 8:0,1, 9:0,1 o 10:0,1 de expresión del CAR con respecto a la etiqueta genética, o cualquier otra relación de CAR con respecto a la etiqueta genética que esté entre cualquiera de las relaciones enumeradas. En algunas alternativas, la etiqueta genética Her2t puede utilizarse en casos donde la expresión del CAR es baja ya que proporciona mejores niveles de expresión transgénica que EGFRt. En algunas alternativas, una etiqueta genética Her2t proporciona un aumento de al menos 1,5 veces, 2 veces, 5 veces o 10 veces de la expresión del transgén en comparación con la etiqueta genética EGFRt, o cualquier otro aumento entre cualesquiera dos de los valores enumerados.

Además en otras alternativas, se seleccionan linfocitos T que expresan receptores quiméricos transducidos que pueden persistir *in vivo* usando un modelo animal establecido para el tipo particular de cáncer. En algunas alternativas, se ha mostrado que los linfocitos CD8+ de memoria central del receptor quimérico transducido persisten *in vivo* después de introducción en el animal durante aproximadamente 3 días o más, 10 días o más, 20 días o más, 30 días o más, 40 días o más, o 50 días o más, o cualquier otro momento entre cualesquiera dos de los valores enumerados. La persistencia *in vivo* puede determinarse mediante formación de imágenes con un anticuerpo marcado de forma detectable que se une a una etiqueta genética, tal como Her2t o EGFRt.

La divulgación contempla que en las composiciones se utilizarán combinaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+. En una alternativa, las combinaciones de linfocitos CD4+ transducidos por receptor quimérico pueden combinarse con linfocitos CD8+ transducidos por receptor quimérico de la misma especificidad de ligando o combinarse con linfocitos T CD8+ que son específicos para un ligando tumoral distinto y una etiqueta genética diferente. En otras alternativas, los linfocitos CD8+ transducidos por receptor quimérico se combinan con linfocitos CD4+ transducidos por receptor quimérico específicos para un ligando diferente expresado en el tumor. En otra alternativa más, se combinan linfocitos CD4+ y CD8+ modificados con receptor quimérico. En algunas alternativas, los linfocitos CD8+ y CD4+ pueden combinarse en diferentes relaciones, por ejemplo, una relación 1:1 de CD8+ y CD4+, una relación 10:1 de CD8+ a CD4+, o una relación de 100:1 de CD8+ a CD4+, o cualquier otra relación de CD8+ a CD4+ que se encuentre entre cualesquiera dos de los valores de relación enumerados. En algunas alternativas, la población combinada se somete a ensayo para proliferación celular *in vitro* y/o *in vivo*, y se selecciona la relación de células que proporciona proliferación celular.

Antes o después de transducción y/o selección de células portadoras de receptores quiméricos, las poblaciones celulares se expanden preferentemente *in vitro* hasta que se obtiene un número suficiente de células para proporcionar al menos una infusión en un sujeto humano, normalmente de 10^4 células/kg a 10^9 células/kg aproximadamente. En algunas alternativas, las células transducidas se cultivan en presencia de células portadoras de antígeno, anti-CD3, anti-CD28 e IL 2, IL-7, IL 15 y/o IL-21 y combinaciones de las mismas.

Cada una de las subpoblaciones de linfocitos CD4+ y CD8+ pueden combinarse entre sí. En una alternativa específica, los linfocitos CD4+ sin activación previa o de memoria central modificados se combinan con linfocitos T CD8+ de memoria central modificados para proporcionar un efecto citotóxico sinérgico en las células portadoras de antígenos, tales como células tumorales.

Composiciones

La divulgación proporciona una composición de inmunoterapia celular adoptiva que comprende una preparación de linfocitos T genéticamente modificados como se describe en el presente documento.

En algunas alternativas, la preparación de linfocitos T comprende linfocitos T CD4+ que tienen un receptor quimérico que comprende un dominio variable de anticuerpo extracelular específico para un ligando asociado a la enfermedad o trastorno, una región espaciadora, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de un receptor de linfocitos T y una etiqueta genética como se describen en el presente documento. En otras alternativas de acuerdo con la divulgación, una composición de inmunoterapia celular adoptiva comprende además una preparación de linfocitos T CD8+ citotóxicos específicos de tumor modificados con receptor quimérico que proporciona una respuesta inmunitaria celular, en donde la preparación de linfocitos T citotóxicos comprende linfocitos T CD8+ que tienen un receptor quimérico que comprende un anticuerpo monocatenario extracelular específico para un ligando asociado a la enfermedad o trastorno, una región espaciadora, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de un receptor de linfocitos T y una etiqueta genética como se describe en el presente documento. En algunas alternativas, la población de linfocitos T modificada con receptor quimérico de la divulgación puede persistir *in vivo* durante al menos aproximadamente 3 días o más. De acuerdo con la divulgación, alternativamente, cada una de estas poblaciones puede combinarse entre sí o con otros tipos de células para proporcionar una composición.

Algunas alternativas incluyen células hospedadoras CD4 y/o CD8 como se describe en el presente documento. En algunas alternativas, una célula hospedadora comprende un ácido nucleico aislado, tal como un ácido nucleico que codifica un polipéptido aislado que comprende al menos un 95 % de identidad de secuencia con un polipéptido de un dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 511 a 652 o 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 unido a un dominio transmembrana, en donde el polipéptido aislado se une específicamente a un anticuerpo que se une a un epítipo en el Dominio IV de Her2, y un segundo ácido nucleico que codifica un segundo receptor antigénico quimérico y una segunda etiqueta genética. En algunas alternativas, las células hospedadoras son linfocitos T precursores. En algunas alternativas, las células hospedadoras son células madre hematopoyéticas.

En otras alternativas de acuerdo con la divulgación, una composición comprende una primera célula hospedadora que comprende un primer ácido nucleico aislado, tal como un ácido nucleico que codifica un polipéptido aislado que comprende al menos un 95 % de identidad de secuencia con un polipéptido de un dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 511 a 652 o 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 unido a un dominio transmembrana, en donde el polipéptido aislado se une específicamente a un anticuerpo que se une a un epítipo en el Dominio IV de Her2, y una segunda célula hospedadora que comprende un segundo ácido nucleico que codifica un segundo receptor antigénico quimérico y una segunda etiqueta genética. En algunas alternativas, la primera célula hospedadora y la segunda célula hospedadora pueden ser las mismas o un tipo diferente de células hospedadoras, por ejemplo, la primera célula hospedadora puede ser un linfocito CD8 de memoria central y la segunda célula hospedadora puede ser un linfocito CD4 sin activación previa. En algunas alternativas, cada una de la primera y segunda células hospedadoras se seleccionan entre el grupo que consiste en linfocitos T CD8, linfocitos T CD4, linfocitos T CD4 sin activación previa, linfocitos T CD8 sin activación previa, linfocitos CD8 de memoria central, linfocitos CD4 de memoria central, y combinaciones de los mismos.

En algunas alternativas, el linfocito auxiliar T CD4+ se selecciona entre el grupo que consiste en linfocitos T CD4+ sin activación previa, linfocitos T CD4+ de memoria central, linfocitos T CD4+ de memoria efectora, o linfocitos T CD4+ voluminosos. En algunas alternativas, el linfocito auxiliar CD4+ es un linfocito T CD4+ sin activación previa, en donde el linfocito T CD4+ sin activación previa comprende un linfocito T CD45RO-, CD45RA+, CD62L+ CD4+.

En algunas alternativas, el linfocito T CD8+ citotóxico se selecciona entre el grupo que consiste en linfocitos T CD8+ sin activación previa, linfocitos T CD8+ de memoria central, linfocitos T CD8+ de memoria efectora o linfocitos T CD8+ voluminosos. En algunas alternativas, el linfocito T CD8+ citotóxico es un linfocito T de memoria central en donde el linfocito T de memoria central comprende un linfocito T CD45RO+, CD62L+, CD8+. Además, en otras alternativas, el linfocito T CD8+ citotóxico es un linfocito T de memoria central y el linfocito T CD4+ auxiliar es un linfocito T CD4+ sin activación previa o de memoria central.

Métodos

La divulgación proporciona métodos para fabricar composiciones de inmunoterapia adoptiva y usos o métodos de uso de estas composiciones para realizar inmunoterapia celular en un sujeto con una enfermedad o trastorno.

Algunas alternativas de acuerdo con la divulgación incluyen métodos para fabricar composiciones que comprenden células hospedadoras como se describe en el presente documento. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, un método comprende introducir un ácido nucleico aislado, tal como un ácido nucleico que codifica polipéptido aislado que comprende al menos un 95 % de identidad de secuencia con un polipéptido de un dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 511 a 652 o 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 unido a un dominio transmembrana, en donde el polipéptido aislado se une específicamente a un anticuerpo que se une a un epítipo en el Dominio IV de Her2, en una célula hospedadora; y cultivar las células hospedadoras en un medio que comprende al menos un factor de crecimiento. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, un método comprende además seleccionar las células hospedadoras para expresión de Her2t antes o después o tanto antes como después de la etapa de cultivo. En otras alternativas de acuerdo con la divulgación, un método de fabricación comprende además introducir un segundo ácido nucleico que codifica un segundo receptor antigénico quimérico y una segunda etiqueta genética en la célula hospedadora. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, el método comprende además seleccionar las células hospedadoras para expresión de la segunda etiqueta genética antes o después o tanto antes como después de la etapa de cultivo. En algunas alternativas, las células hospedadoras son linfocitos T precursores. En algunas alternativas, las células hospedadoras son células madre hematopoyéticas.

En otras alternativas de acuerdo con la divulgación, un método comprende introducir un primer ácido nucleico aislado, tal como un ácido nucleico que codifica polipéptido aislado que comprende al menos un 95 % de identidad de secuencia con un polipéptido de un dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 511 a 652 o 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 unido a un dominio transmembrana, en donde el polipéptido aislado se une específicamente a un anticuerpo que se une a un epítipo en el Dominio IV de Her2, en una primera célula hospedadora; seleccionar primeras células hospedadoras que expresan Her2t, introducir un segundo ácido nucleico que codifica un segundo receptor antigénico quimérico y una segunda etiqueta genética en una segunda célula hospedadora, seleccionar segundas células hospedadoras para expresión de la segunda etiqueta genética, y opcionalmente, cultivar la primera y segunda células hospedadoras en un medio que comprende al menos un factor de crecimiento. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, una composición comprende una primera y segunda población de células hospedadoras.

En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, un método de fabricación de las composiciones comprende obtener un linfocito T CD4+ auxiliar sin activación previa o de memoria central modificado, en donde la preparación de linfocitos T auxiliares modificados comprende linfocitos T CD4+ que tienen un receptor quimérico que comprende un dominio de unión a ligando específico para una molécula de superficie celular tumoral, un dominio espaciador, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular y una etiqueta genética como se describe en el presente documento.

En otra alternativa de acuerdo con la divulgación, un método comprende además obtener un linfocito T CD8+ de memoria central modificado, en donde la preparación de linfocitos T CD8 de memoria central modificados comprende linfocitos CD8+ que tienen un receptor quimérico que comprende un dominio de unión a ligando específico para una molécula de superficie celular tumoral, un dominio espaciador, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular y una etiqueta genética como se describe en el presente documento. En otras alternativas, los linfocitos CD8+ tienen un receptor de citoquina y/o quimioquina bajo el control de un promotor inducible.

El receptor antigénico quimérico y la etiqueta genética tanto en linfocitos T CD4+ modificados como en linfocitos T CD8+ citotóxicos pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, linfocitos T CD4+ modificados que tienen un primer CAR y una primera etiqueta genética, mientras que el linfocito T CD8+ citotóxico comprende linfocitos CD8+ que tienen un segundo CAR diferente y una segunda etiqueta genética diferente. En algunas alternativas, el polinucleótido puede codificar un receptor antigénico quimérico que es el mismo en la población de linfocitos tanto CD4+ como CD8+. La diferencia entre los dos constructos de CAR puede incluir la especificidad o afinidad del dominio de unión a ligando

para un antígeno o epítipo, la longitud y secuencia de la región espaciadora, y los componentes de señalización intracelular.

La preparación de los linfocitos CD4+ y CD8+ que se modifican con un receptor quimérico se ha descrito anteriormente así como en los ejemplos. Los linfocitos T específicos de antígeno pueden obtenerse de un paciente que padece la enfermedad o trastorno o pueden prepararse mediante estimulación *in vitro* de linfocitos T en presencia de antígeno. Las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ que no se seleccionan por su especificidad antigénica también pueden aislarse como se describe en el presente documento y combinarse en los métodos de fabricación. Las poblaciones celulares se seleccionan ventajosamente para expresión de una o más etiquetas genéticas, tales como Her2t y/o EGFRt.

En algunas alternativas, la combinación de poblaciones celulares puede evaluarse para determinar la uniformidad de marcadores de la superficie celular, la capacidad para proliferar durante al menos dos generaciones, para tener un estado de diferenciación celular uniforme. El control de calidad puede realizarse determinando la relación de expresión de CAR con respecto a la expresión de la etiqueta genética. El estado de diferenciación celular y los marcadores de superficie celular en los linfocitos T modificados con receptor quimérico pueden determinarse mediante citometría de flujo. En algunas alternativas, los marcadores y el estado de diferenciación celular en los linfocitos CD8+ incluyen CD3, CD8, CD62L, CD28, CD27, CD69, CD25, PD-1, CTLA-4, CD45RO y/o CD45RA. En algunas alternativas, los marcadores y el estado de diferenciación celular en los linfocitos CD4+ incluyen CD3, CD4, CD62L, CD28, CD27, CD69, CD25, PD-1, CTLA-4 CD45RO y/o CD45RA.

En algunas alternativas, los linfocitos T modificados con receptor quimérico como se describe en el presente documento pueden persistir *in vivo* durante al menos 3 días, o al menos 10 días. En algunas alternativas, los linfocitos T modificados con receptor quimérico como se describe en el presente documento pueden persistir *in vivo* durante al menos 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, o 10 días o cualquier periodo dentro del intervalo definido por cualesquiera dos de los periodos de tiempo mencionados anteriormente. En algunas alternativas, los linfocitos T modificados con receptor quimérico pueden proliferar *in vivo* durante al menos 2, o al menos 3 generaciones tal como se determina mediante dilución de colorante CFSE. La proliferación y persistencia de los linfocitos T modificados con receptor quimérico puede determinarse usando un modelo animal de la enfermedad o trastorno y administrando las células y determinando la persistencia y/o capacidad proliferativa de las células transferidas detectando las células usando un anticuerpo marcado de forma detectable que se une a la etiqueta genética tal como Erbitux (EGFRt) y/o Herceptin (Her2t). Cuando se usan o fragmentos de unión a anticuerpo o antígeno para detectar células que expresan transgén *in vivo*, y un fragmento de unión a anticuerpo o antígeno, preferentemente no incluye una porción de Fc para minimizar cualquier reacción de ADCC. En otras alternativas, la proliferación y la activación pueden someterse a ensayo *in vitro* pasando por múltiples ciclos de activación con células portadoras de antígenos.

La divulgación también proporciona métodos para realizar inmunoterapia celular en un sujeto que padece una enfermedad o trastorno que comprende: administrar una composición de linfocitos que expresan uno o más de receptor antigénico quimérico y etiqueta genética, como se describe en el presente documento. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, se proporciona un método para realizar inmunoterapia celular en un sujeto que padece una enfermedad o trastorno, en donde el método comprende administrar una composición de linfocitos que expresan uno o más de receptor antigénico quimérico y etiqueta genética.

De acuerdo con la divulgación, las alternativas incluyen un método para tratar a un paciente con cáncer que expresa un antígeno tumoral que comprende administrar una cantidad eficaz de una composición como se describe en el presente documento, en donde las células de la composición expresan un receptor antigénico quimérico que comprende un dominio de unión a antígeno que se une al antígeno tumoral expresado en la célula cancerosa y una etiqueta genética. En algunas alternativas, el cáncer tiene un antígeno tumoral reconocido por el receptor antigénico quimérico en las células. En algunas alternativas, el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer de mama, linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma, ALL, CLL y mieloma múltiple.

En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, un método para tratar pacientes que tienen cáncer que expresa un antígeno tumoral comprende administrar una cantidad eficaz de una composición como se describe en el presente documento, en donde las células de la composición expresan un primer receptor antigénico quimérico que comprende un dominio de unión a antígeno que se une al antígeno tumoral expresado en la célula cancerosa y una primera etiqueta genética y un segundo receptor antigénico quimérico que comprende un dominio de unión a antígeno que se une al antígeno tumoral expresado en la célula cancerosa y una segunda etiqueta genética.

En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, un método para tratar a un paciente con cáncer que expresa un antígeno tumoral comprende administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende una primera célula hospedadora que expresa un primer receptor antigénico quimérico que comprende un dominio de unión a antígeno que se une al antígeno tumoral expresado en la célula cancerosa y una primera etiqueta genética y una segunda célula hospedadora que comprende un segundo receptor antigénico quimérico que comprende un dominio de unión a antígeno que se une al antígeno tumoral expresado en la célula cancerosa y una segunda etiqueta genética. En algunas alternativas, las células hospedadoras son linfocitos T precursores. En algunas alternativas, las células hospedadoras son células madre hematopoyéticas.

En otras alternativas de acuerdo con la divulgación, se proporciona un método para tratar a un paciente con tiene cáncer y/o que expresa un antígeno tumoral, en donde el método comprende administrar una cantidad eficaz de una composición como se describe en el presente documento y un anticuerpo que se une específicamente a la etiqueta genética, en donde las células de la composición expresan un receptor antigénico quimérico que comprende un dominio de unión a antígeno que se une al antígeno tumoral expresado en la célula cancerosa y una etiqueta genética. En algunas alternativas, el anticuerpo se une al Dominio IV de Her2, o se une a EGFRt. En algunas alternativas, los anticuerpos son Herceptin o Erbitux.

En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, si se observa un efecto tóxico de la composición, se administra un anticuerpo que se une a la etiqueta genética. El anticuerpo puede unirse y destruir las células que expresan CAR de la composición para evitar efectos secundarios tóxicos y/o mortales. En algunas alternativas, el fragmento de unión a anticuerpo o antígeno contiene preferentemente un fragmento de Fc para activar las reacciones de ADCC. En otras alternativas, el fragmento de unión a anticuerpo o antígeno está conjugado con un agente citotóxico. Los agentes citotóxicos incluyen cantansinoides, calicheamicina y/o auristatinas. En algunas alternativas, los agentes citotóxicos comprenden cantansinoides, calicheamicina y/o auristatinas.

En algunas alternativas, un anticuerpo se marca de forma detectable para permitir el rastreo de las células *in vivo*. En algunas alternativas, cuando el anticuerpo se usa para detección *in vivo*, es preferente que el fragmento de unión a anticuerpo o antígeno carezca de toda o una porción de la región para evitar reacciones de ADCC. Las etiquetas detectables incluyen biotina, etiquetas de His, etiquetas de myc, radioetiquetas y/o etiquetas fluorescentes. En algunas alternativas, las etiquetas detectables comprenden biotina, etiquetas de His, etiquetas de myc, etiquetas radiactivas y/o etiquetas fluorescentes.

En otras alternativas, un método de acuerdo con la divulgación comprende administrar al sujeto una preparación de linfocitos T citotóxicos modificados genéticamente que proporciona una respuesta celular inmunitaria, en donde la preparación de linfocitos T citotóxicos comprende linfocitos T CD8+ que tienen un receptor quimérico que comprende un dominio de unión a ligando específico para una molécula de superficie de la célula tumoral, un dominio espaciador, un dominio transmembrana, and an dominio de señalización intracelular y una primera etiqueta genética como se describe en el presente documento, y/o una preparación de linfocitos T auxiliares modificados genéticamente que provoca reconocimiento directo de tumores y aumenta la capacidad de las preparaciones de linfocitos T citotóxicos modificados genéticamente para mediar una respuesta celular inmunitaria, en donde la preparación de linfocitos T auxiliares comprende linfocitos T CD4+ que tienen un receptor quimérico que comprende un dominio de unión a ligando específico para una molécula de superficie de la célula tumoral, un dominio espaciador, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular y una segunda etiqueta genética.

Otra alternativa de acuerdo con la divulgación describe un método para realizar inmunoterapia celular en un sujeto que padece una enfermedad o trastorno que comprende: analizar una muestra biológica del sujeto para detectar la presencia de una molécula diana asociada a la enfermedad o trastorno y administrar las composiciones de inmunoterapia adoptiva descritas en el presente documento, en donde el receptor quimérico se une específicamente a la molécula diana.

Los sujetos que pueden tratarse mediante la presente invención son, en general, sujetos humanos y otros primates, tales como monos y simios para fines de medicina veterinaria. Los sujetos pueden ser masculinos o femeninos y pueden tener cualquier edad adecuada, incluyendo sujetos lactantes, juveniles, adolescentes, adultos y geriátricos. En algunas alternativas, el sujeto es un sujeto primate o un ser humano.

Los métodos son útiles en el tratamiento de, por ejemplo, neoplasias hematológicas, melanoma, cáncer de mama y otras neoplasias epiteliales o tumores sólidos. En algunas alternativas, la molécula asociada a la enfermedad o trastorno se selecciona entre el grupo que consiste en receptor huérfano de tirosina quinasa ROR1, Her2, EGFR, CE7, hB7H3, CD19, CD20, CD22, mesotelina, CEA y antígeno de superficie de hepatitis B.

Los sujetos que pueden tratarse incluyen sujetos que padecen cáncer, que incluye, pero no se limita a, cáncer de colon, pulmón, hígado, mama, renal, próstata, ovario, piel (incluyendo melanoma), hueso y cerebral, etc. En algunas alternativas, se conocen antígenos o moléculas asociados a tumor, tales como melanoma, cáncer de mama, carcinoma de células escamosas, cáncer de colon, leucemia, mieloma y cáncer de próstata. En otras alternativas, las moléculas asociadas a tumor pueden dirigirse con linfocitos T modificados genéticamente que expresan un receptor quimérico manipulado. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, linfoma de linfocitos B, cáncer de mama, cáncer de próstata y leucemia. En algunas alternativas, el sujeto tiene linfoma de linfocitos B, cáncer de mama, cáncer de próstata y/o leucemia.

Las células preparadas como se describió anteriormente pueden utilizarse en métodos y composiciones para inmunoterapia adoptiva de acuerdo con técnicas conocidas, o variaciones de las mismas, que serán evidentes para los expertos en la materia basándose en la presente divulgación.

En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, las células se formulan recogiendo primero de su medio de

cultivo y a continuación lavándolas y concentrándolas en un medio y sistema de contenedor adecuados para administración (un "vehículo farmacéuticamente aceptable") en una cantidad eficaz para el tratamiento. El medio de infusión adecuado puede ser cualquier formulación de medio isotónico, normalmente solución salina normal, Normosol R (Abbott) o Plasma-Lyte A (Baxter), pero también puede utilizarse dextrosa al 5 % en agua o lactato de Ringer. El medio de infusión puede suplementarse con albúmina de suero humano, suero bovino fetal u otros componentes del suero humano.

En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, una cantidad eficaz para el tratamiento de células en la composición es un linfocito CD4 o CD8 transducido o al menos 2 subconjuntos celulares (por ejemplo, 1 subconjunto de linfocitos T CD8+ de memoria central y 1 subconjunto de linfocitos T CD4+ auxiliares) o es más normalmente superior a 10^2 células, y hasta 10^6 , hasta e incluyendo 10^8 o 10^9 células y puede ser superior a 10^{10} células o cualquier cantidad de células definidas entre cualesquiera dos extremos de cualquiera de los valores enumerados.

El número de células dependerá del uso final para el que se destine la composición, al igual que el tipo de células incluidas en la misma. Por ejemplo, si se desean células que sean específicas para un antígeno en particular, entonces la población contendrá más de un 70 %, generalmente más de un 80 %, 85 % y un 90-95 % de tales células o cualquier porcentaje de cantidad de células dentro de un intervalo definido por cualesquiera dos de los porcentajes mencionados anteriormente.

Para los usos proporcionados en el presente documento, las células tienen generalmente un volumen de un litro o inferior pero superior a 1 nl, puede ser de 500 ml o inferior pero superior a 1 nl, incluso 250 ml o 100 ml o inferior pero superior a 1 nl, o cualquier volumen definido entre dos extremos de cualquiera de los valores enumerados.

Por lo tanto, la densidad de las células deseadas es normalmente mayor que 10^4 células/ml y generalmente es mayor que 10^7 células/ml, generalmente 10^8 células/ml o mayor. El número clínicamente relevante de células inmunitarias puede distribuirse en múltiples infusiones que acumulativamente igualen o superen 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} o 10^{11} células o cualquier cantidad de células dentro de un intervalo definido por dos de las cantidades mencionadas anteriormente.

En algunas alternativas, los linfocitos pueden usarse para conferir inmunidad a los individuos. Por "inmunidad" se entiende una disminución de uno o más síntomas físicos asociados a una respuesta a la infección por un patógeno, o un tumor, al que se dirige la respuesta linfocitaria. La cantidad de células administradas suele estar en el intervalo presente en individuos normales con inmunidad al patógeno. Por lo tanto, las células se administran habitualmente por infusión, con cada infusión en un intervalo de 2 células, hasta al menos 10^6 a 3×10^{10} células, preferentemente en el intervalo de al menos 10^7 a 10^9 células o cualquier cantidad de células dentro de un intervalo definido por dos de las cantidades mencionadas anteriormente.

Los linfocitos T pueden administrarse mediante una única infusión o mediante infusiones múltiples durante un intervalo de tiempo. Sin embargo, dado que para diferentes individuos es de esperar que la capacidad de respuesta varíe, el tipo y la cantidad de células infundidas, así como el número de infusiones y el intervalo de tiempo durante el cual se administran múltiples infusiones lo determina el médico tratante, y puede determinarse mediante examen rutinario. La generación de niveles suficientes de linfocitos T (leyendo linfocitos T citotóxicos y/o linfocitos T auxiliares) puede lograrse fácilmente usando el método de expansión rápida de acuerdo con la divulgación, como se hace a modo de ejemplo en el presente documento.

En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, la composición como se describe en el presente documento se administra por vía intravenosa, intraperitoneal, intratumoral, en la médula ósea, en el ganglio linfático y/o en el líquido cefalorraquídeo. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, las composiciones de receptor quimérico manipuladas se envían al sitio del tumor. Alternativamente, de acuerdo con la divulgación, las composiciones, como se describe en el presente documento, pueden combinarse con un compuesto que dirija las células al tumor o los compartimentos del sistema inmunitario y evitar sitios tales como el pulmón.

En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, las composiciones, como se describe en el presente documento, se administran con agentes quimioterapéuticos y/o inmunosupresores. En una alternativa de acuerdo con la divulgación, primero se trata a un paciente con un agente quimioterapéutico, que inhibe o destruye otras células inmunitarias, seguido de las composiciones descritas en el presente documento. En algunos casos, la quimioterapia puede evitarse por completo. La presente invención se ilustra además en los ejemplos que se presentan a continuación.

Alternativas adicionales

En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, se proporciona un polipéptido aislado, en donde el polipéptido aislado comprende al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % de identidad de secuencia con un polipéptido de un dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 unido a un dominio transmembrana, en donde el polipéptido aislado se une específicamente a un anticuerpo que se une a un epítipo en el Dominio IV de Her2, y en donde el polipéptido aislado excluye al HER2 maduro de longitud

completa. En algunas alternativas, el polipéptido HER2 comprende los aminoácidos ácido glutámico 580, ácido aspártico 582, ácido aspártico 592, fenilalanina 595, y glutamina 624 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el polipéptido HER2 comprende los aminoácidos 563-652 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el dominio transmembrana comprende los aminoácidos 653-675 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el polipéptido aislado comprende además un péptido líder que proporciona expresión en la superficie celular. En algunas alternativas, el péptido líder tiene la secuencia de SEQ ID NO: 17. En algunas alternativas, el anticuerpo es trastuzumab.

En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, se proporciona un polipéptido aislado en donde el polipéptido aislado comprende al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % de identidad de secuencia con un polipéptido de un dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 unido a un dominio transmembrana, en donde el polipéptido aislado se une específicamente a un anticuerpo que se une a un epítipo en el Dominio IV de Her2, y en donde el polipéptido aislado excluye al HER maduro de longitud completa, y en donde el dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 está unido al dominio transmembrana mediante una secuencia que comprende los aminoácidos GGGSGGGS (SEQ ID NO: 45). En algunas alternativas, el polipéptido HER2 comprende los aminoácidos ácido glutámico 580, ácido aspártico 582, ácido aspártico 592, fenilalanina 595, y glutamina 624 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el polipéptido HER2 comprende los aminoácidos 563-652 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el dominio transmembrana comprende los aminoácidos 653-675 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el polipéptido aislado comprende además un péptido líder que proporciona expresión en la superficie celular. En algunas alternativas, el péptido líder comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 17. En algunas alternativas, el anticuerpo es trastuzumab.

En algunas alternativas, se proporciona un ácido nucleico aislado en donde el ácido nucleico aislado codifica un polipéptido. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, el polipéptido aislado comprende al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % de identidad de secuencia con un polipéptido de un dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 unido a un dominio transmembrana, en donde el polipéptido aislado se une específicamente a un anticuerpo que se une a un epítipo en el Dominio IV de Her2, y en donde el polipéptido aislado excluye al HER2 maduro de longitud completa. En algunas alternativas, el polipéptido HER2 comprende los aminoácidos ácido glutámico 580, ácido aspártico 582, ácido aspártico 592, fenilalanina 595, y glutamina 624 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el polipéptido HER2 comprende los aminoácidos 563-652 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el dominio transmembrana comprende los aminoácidos 653-675 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el polipéptido aislado comprende además un péptido líder que proporciona expresión en la superficie celular. En algunas alternativas, el péptido líder tiene la secuencia de SEQ ID NO: 17. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, el anticuerpo es trastuzumab. En algunas alternativas, el polipéptido aislado comprende al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % de identidad de secuencia con un polipéptido de un dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 unido a un dominio transmembrana, en donde el polipéptido aislado se une específicamente a un anticuerpo que se une a un epítipo en el Dominio IV de Her2, y en donde el polipéptido aislado excluye al HER maduro de longitud completa, y en donde el dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 está unido al dominio transmembrana mediante una secuencia que comprende los aminoácidos GGGSGGGS (SEQ ID NO: 45). En algunas alternativas, el polipéptido HER2 comprende los aminoácidos ácido glutámico 580, ácido aspártico 582, ácido aspártico 592, fenilalanina 595, y glutamina 624 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el polipéptido HER2 comprende los aminoácidos 563-652 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el dominio transmembrana comprende los aminoácidos 653-675 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el polipéptido aislado comprende además un péptido líder que proporciona expresión en la superficie celular. En algunas alternativas, el péptido líder comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 17. En algunas alternativas, el anticuerpo es trastuzumab. En algunas alternativas, el ácido nucleico aislado comprende además un promotor. En algunas alternativas, el ácido nucleico aislado comprende además un transgén. En algunas alternativas, el transgén comprende un polinucleótido que codifica un receptor antigénico quimérico. En algunas alternativas, el receptor antigénico quimérico comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio espaciador, un dominio transmembrana y al menos un dominio estimulador. En algunas alternativas, el polinucleótido que codifica el transgén está unido al ácido nucleico que codifica el polipéptido HER2 con un conector de autoescisión. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, el polipéptido HER2 comprende al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % de identidad de secuencia con un polipéptido de un dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 unido a un dominio transmembrana, en donde el polipéptido aislado se une específicamente a un anticuerpo que se une a un epítipo en el Dominio IV de Her2, y en donde el polipéptido aislado excluye al HER2 maduro de longitud completa. En algunas alternativas, el conector de autoescisión es un conector T2A que tiene la secuencia L E G G G E G R G S L LTC G (SEQ ID NO: 26). En algunas alternativas, el receptor antigénico quimérico comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En algunas alternativas, el receptor antigénico quimérico comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 (CD20CAR). En algunas alternativas, el tamaño del ácido nucleico aislado comprende un tamaño de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 14,9 Kb, o cualquier tamaño entre cualesquiera dos de los tamaños del constructo enumerados.

En algunas alternativas, se proporciona una célula hospedadora en donde la célula hospedadora comprende un ácido

nucleico aislado, en donde el ácido nucleico aislado codifica un polipéptido. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, el polipéptido aislado comprende al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % de identidad de secuencia con un polipéptido de un dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 unido a un dominio transmembrana, en donde el polipéptido aislado se une específicamente a un anticuerpo que se une a un epítipo en el Dominio IV de Her2, y en donde el polipéptido aislado excluye al HER2 maduro de longitud completa. En algunas alternativas, el polipéptido HER2 comprende los aminoácidos ácido glutámico 580, ácido aspártico 582, ácido aspártico 592, fenilalanina 595, y glutamina 624 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el polipéptido HER2 comprende los aminoácidos 563-652 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el dominio transmembrana comprende los aminoácidos 653-675 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el polipéptido aislado comprende además un péptido líder que proporciona expresión en la superficie celular. En algunas alternativas, el péptido líder tiene la secuencia de SEQ ID NO: 17. En algunas alternativas, el anticuerpo es trastuzumab. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, el polipéptido aislado comprende al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % de identidad de secuencia con un polipéptido de un dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 unido a un dominio transmembrana, en donde el polipéptido aislado se une específicamente a un anticuerpo que se une a un epítipo en el Dominio IV de Her2, y en donde el polipéptido aislado excluye al HER2 maduro de longitud completa, y en donde el dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 está unido al dominio transmembrana mediante una secuencia que comprende los aminoácidos GGGSGGGS (SEQ ID NO: 45). En algunas alternativas, el polipéptido HER2 comprende los aminoácidos ácido glutámico 580, ácido aspártico 582, ácido aspártico 592, fenilalanina 595, y glutamina 624 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el polipéptido HER2 comprende los aminoácidos 563-652 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el dominio transmembrana comprende los aminoácidos 653-675 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el polipéptido aislado comprende además un péptido líder que proporciona expresión en la superficie celular. En algunas alternativas, el péptido líder comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 17. En algunas alternativas, el anticuerpo es trastuzumab. En algunas alternativas, el ácido nucleico aislado comprende además un promotor. En algunas alternativas, el ácido nucleico aislado comprende además un transgén. En algunas alternativas, el transgén comprende un polinucleótido que codifica un receptor antigénico quimérico. En algunas alternativas, el receptor antigénico quimérico comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio espaciador, un dominio transmembrana y al menos un dominio estimulador. En algunas alternativas, el polinucleótido que codifica el transgén está unido al ácido nucleico que codifica el polipéptido HER2 con un conector de autoescisión. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, el polipéptido HER2 comprende al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % de identidad de secuencia con un polipéptido de un dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 unido a un dominio transmembrana, en donde el polipéptido aislado se une específicamente a un anticuerpo que se une a un epítipo en el Dominio IV de Her2, y en donde el polipéptido aislado excluye al HER2 maduro de longitud completa. En algunas alternativas, el conector de autoescisión es un conector T2A que tiene la secuencia L E G G G E G R G S L L T C G (SEQ ID NO: 26). En algunas alternativas, el receptor antigénico quimérico comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En algunas alternativas, el receptor antigénico quimérico comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 (CD20CAR). En algunas alternativas, la célula hospedadora se selecciona entre el grupo que consiste en linfocitos T CD8, linfocitos T CD4, linfocitos T CD4 sin activación previa, linfocitos T CD8 sin activación previa, y linfocitos CD48 de memoria central, y linfocitos CD4 de memoria central, o combinaciones de los mismos. En algunas alternativas, la célula hospedadora es autóloga. En algunas alternativas, la célula hospedadora es específica de antígeno. En algunas alternativas, las células hospedadoras son linfocitos T precursores. En algunas alternativas, las células hospedadoras son células madre hematopoyéticas. En algunas alternativas, el tamaño del ácido nucleico aislado comprende un tamaño de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 14,9 Kb, o cualquier tamaño entre cualesquiera dos de los tamaños del constructo enumerados.

En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, se proporciona una composición que comprende células hospedadoras en donde las células hospedadoras comprenden un ácido nucleico aislado, en donde el ácido nucleico aislado codifica un polipéptido. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, el polipéptido aislado comprende al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % de identidad de secuencia con un polipéptido de un dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 unido a un dominio transmembrana, en donde el polipéptido aislado se une específicamente a un anticuerpo que se une a un epítipo en el Dominio IV de Her2, y en donde el polipéptido aislado excluye al HER2 maduro de longitud completa. En algunas alternativas, el polipéptido HER2 comprende los aminoácidos ácido glutámico 580, ácido aspártico 582, ácido aspártico 592, fenilalanina 595, y glutamina 624 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el polipéptido HER2 comprende los aminoácidos 563-652 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el dominio transmembrana comprende los aminoácidos 653-675 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el polipéptido aislado comprende además un péptido líder que proporciona expresión en la superficie celular. En algunas alternativas, el péptido líder tiene la secuencia de SEQ ID NO: 17. En algunas alternativas, el anticuerpo es trastuzumab. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, el polipéptido aislado comprende al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % de identidad de secuencia con un polipéptido de un dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 unido a un dominio transmembrana, en donde el polipéptido aislado se une específicamente a un anticuerpo que se une a un epítipo en el Dominio IV de Her2, y en donde el polipéptido aislado excluye al HER2 maduro de longitud completa, y en donde el dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 está unido al dominio transmembrana mediante una secuencia que comprende los aminoácidos GGGSGGGS (SEQ ID NO: 45). En algunas alternativas, el polipéptido

HER2 comprende los aminoácidos ácido glutámico 580, ácido aspártico 582, ácido aspártico 592, fenilalanina 595, y glutamina 624 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el polipéptido HER2 comprende los aminoácidos 563-652 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el dominio transmembrana comprende los aminoácidos 653-675 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el polipéptido aislado comprende además un péptido líder que proporciona expresión en la superficie celular. En algunas alternativas, el péptido líder comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 17. En algunas alternativas, el anticuerpo es trastuzumab. En algunas alternativas, el ácido nucleico aislado comprende además un promotor. En algunas alternativas, el ácido nucleico aislado comprende además un transgén. En algunas alternativas, el transgén comprende un polinucleótido que codifica un receptor antigénico quimérico. En algunas alternativas, el receptor antigénico quimérico comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio espaciador, un dominio transmembrana y al menos un dominio estimulador. En algunas alternativas, el polinucleótido que codifica el transgén está unido al ácido nucleico que codifica el polipéptido HER2 con un conector de autoescisión. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, el polipéptido HER2 comprende al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % de identidad de secuencia con un polipéptido de un dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 unido a un dominio transmembrana, en donde el polipéptido aislado se une específicamente a un anticuerpo que se une a un epítipo en el Dominio IV de Her2, y en donde el polipéptido aislado excluye al HER2 maduro de longitud completa. En algunas alternativas, el conector de autoescisión es un conector T2A que tiene la secuencia L E G G G E G R G S L L T C G (SEQ ID NO: 26). En algunas alternativas, el receptor antigénico quimérico comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En algunas alternativas, el receptor antigénico quimérico comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 (CD20CAR). En algunas alternativas, la célula hospedadora se selecciona entre el grupo que consiste en linfocitos T CD8, linfocitos T CD4, linfocitos T CD4 sin activación previa, linfocitos CD8 de memoria central, y linfocitos CD4 de memoria central, o combinaciones de los mismos. En algunas alternativas, la célula hospedadora es autóloga. En algunas alternativas, la célula hospedadora es específica de antígeno. En algunas alternativas, las células hospedadoras son linfocitos T precursores. En algunas alternativas, las células hospedadoras son células madre hematopoyéticas. En algunas alternativas, el tamaño del ácido nucleico aislado comprende un tamaño de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 14,9 Kb, o cualquier tamaño entre cualesquiera dos de los tamaños del constructo enumerados.

En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, se proporciona un método para fabricar una composición, en donde el método comprende introducir un ácido nucleico aislado en una célula hospedadora y cultivar las células hospedadoras en un medio que comprende al menos un factor de crecimiento. En algunas alternativas, el ácido nucleico aislado codifica un polipéptido. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, el polipéptido aislado comprende al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % de identidad de secuencia con un polipéptido de un dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 unido a un dominio transmembrana, en donde el polipéptido aislado se une específicamente a un anticuerpo que se une a un epítipo en el Dominio IV de Her2, y en donde el polipéptido aislado excluye al HER2 maduro de longitud completa. En algunas alternativas, el polipéptido HER2 comprende los aminoácidos ácido glutámico 580, ácido aspártico 582, ácido aspártico 592, fenilalanina 595, y glutamina 624 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el polipéptido HER2 comprende los aminoácidos 563-652 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el dominio transmembrana comprende los aminoácidos 653-675 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el polipéptido aislado comprende además un péptido líder que proporciona expresión en la superficie celular. En algunas alternativas, el péptido líder tiene la secuencia de SEQ ID NO: 17. En algunas alternativas, el anticuerpo es trastuzumab. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, el polipéptido aislado comprende al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % de identidad de secuencia con un polipéptido de un dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 unido a un dominio transmembrana, en donde el polipéptido aislado se une específicamente a un anticuerpo que se une a un epítipo en el Dominio IV de Her2, y en donde el polipéptido aislado excluye al HER maduro de longitud completa, y en donde el dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 está unido al dominio transmembrana mediante una secuencia que comprende los aminoácidos GGGSGGGS (SEQ ID NO: 45). En algunas alternativas, el polipéptido HER2 comprende los aminoácidos ácido glutámico 580, ácido aspártico 582, ácido aspártico 592, fenilalanina 595, y glutamina 624 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el polipéptido HER2 comprende los aminoácidos 563-652 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el dominio transmembrana comprende los aminoácidos 653-675 de SEQ ID NO: 23. En algunas alternativas, el polipéptido aislado comprende además un péptido líder que proporciona expresión en la superficie celular. En algunas alternativas, el péptido líder comprende una secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 17. En algunas alternativas, el anticuerpo es trastuzumab. En algunas alternativas, el ácido nucleico aislado comprende además un promotor. En algunas alternativas, el ácido nucleico aislado comprende además un transgén. En algunas alternativas, el transgén comprende un polinucleótido que codifica un receptor antigénico quimérico. En algunas alternativas, el receptor antigénico quimérico comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio espaciador, un dominio transmembrana y al menos un dominio estimulador. En algunas alternativas, el polinucleótido que codifica el transgén está unido al ácido nucleico que codifica el polipéptido HER2 con un conector de autoescisión. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, el polipéptido HER2 comprende al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % de identidad de secuencia con un polipéptido de un dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene una secuencia de aminoácidos 563 a 652 de SEQ ID NO: 23 unido a un dominio transmembrana, en donde el polipéptido aislado se une específicamente a un anticuerpo que se une a un epítipo en el Dominio IV de Her2, y en donde el polipéptido aislado excluye al HER2 maduro de longitud completa. En algunas alternativas, el conector de autoescisión es un conector T2A que tiene la secuencia L E G G G E G R G S

L L T C G (SEQ ID NO: 26). En algunas alternativas, el receptor antigénico quimérico comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En algunas alternativas, el receptor antigénico quimérico comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 (CD20CAR). En algunas alternativas, la célula hospedadora se selecciona entre el grupo que consiste en linfocitos T CD8, linfocitos T CD4, linfocitos T CD4 sin activación previa, linfocitos T CD8 sin activación previa, linfocitos CD8 de memoria central, y linfocitos CD4 de memoria central, o combinaciones de los mismos. En algunas alternativas, la célula hospedadora es autóloga. En algunas alternativas, la célula hospedadora es específica de antígeno. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, el factor de crecimiento se selecciona entre IL-15, IL-7, IL-21, o IL-2, y combinaciones de los mismos. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, el método comprende además seleccionar células que expresan el polipéptido Her2t. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, las células se seleccionan antes de cultivar las células en el medio. En algunas alternativas, las células se seleccionan usando un anticuerpo que se une al Dominio IV de Her2. En algunas alternativas, el anticuerpo es trastuzumab. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, el método comprende además introducir un segundo ácido nucleico aislado que codifica un receptor antigénico quimérico unido a una segunda etiqueta genética. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, el método comprende además seleccionar células que expresan la segunda etiqueta genética. En algunas alternativas de acuerdo con la divulgación, la segunda etiqueta genética comprende EGFRt.

La preparación de células transducidas que contienen un CAR con una secuencia de marcador her2t se describe a continuación.

Anticuerpos y citometría de flujo

Los controles de isotipo conjugado con fluorocromo, anti-CD3, CD4, CD8, CD45, Her2 y estreptavidina se obtuvieron en BD Biosciences. Cetuximab (Erbix) y trastuzumab (Herceptin) se adquirieron en el Children's Hospital de Seattle. Erbitux y Herceptin se biotinaron (Pierce) o se conjugaron directamente con APC (Solulink), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La adquisición de datos se realizó en un LSRFortessa (BD Biosciences) y el porcentaje de células en una región de análisis se calculó usando el software de análisis de datos FlowJo.

Líneas celulares

Todas las líneas celulares se mantuvieron en RPMI 1640 suplementado con L-glutamina 2 mM, HEPES 25 mM (Irvine Scientific) y suero bovino fetal inactivado por calor al 10 % (Hyclone o Atlas), a menos que se indique lo contrario. Las líneas de células diana de eritroleucemia K562 fueron proporcionadas amablemente por el Dr. Stanley Riddell (Fred Hutchinson Cancer Research Center). Otras líneas celulares de linfoblastos T H9, Raji (linfoma de Burkitt humano) y 293T (derivado altamente transfectable de células 293 de riñón embrionario humano) fueron suministradas por la Colección Americana de Cultivos Tipo. Se prepararon líneas celulares linfoblastoides transformadas con virus de Epstein-Barr (TM-LCL) a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) como se describió anteriormente (Pelloquin *et al.* 1986). Las líneas celulares que expresan GFP:ffluc se transdujeron con GFP:ffluc_epHIV7 y se clasificaron usando el clasificador BD FACSJazz.

Construcción de vectores y preparación de lentivirus que codifican Her2t o EGFRt

El constructo lentiviral 41BB-zeta CD19CAR-T2A-EGFRt_epHIV7 de segunda generación se describió anteriormente (Hudecek *et al.* 2013) (Tabla 1).

El CD20CAR-T2A-EGFRt_epHIV7 contiene un scFv de Leu6 (CD20 antihumano murino) fusionado a la porción de dominio espaciador de Bisagra de IgG4-CH3 (119 aa) humano de IgG4 junto con los mismos componentes de señalización del CD19CAR (4-1BB-zeta) (Tabla 9).

Her2t se sintetizó mediante PCR, usando pDONR223-ErbB2 (Addgene) como molde y el vector lentiviral epHIV7 como receptor (Tablas 6 y 8). El producto final, Her2t_epHIV7, contiene el péptido líder del receptor del factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos humanos (GMCSFRss) fusionado en marco al dominio IV (aa 563-652) y los componentes transmembrana de Her2 (aa 653-675). Her2t reemplazó a EGFRt en el constructo CD19CAR-T2A-EGFRt_epHIV7 mediante PCR y clonación de Gibson. EGFRt se sintetizó como se describió anteriormente (Wang *et al.* 2011) (Tabla 7).

Los lentivirus que codifican CD19CAR-T2A-Her2t, CD19CAR-T2A-EGFRt, CD20CAR-T2A-EGFRt, Her2t, y EGFRt se produjeron en células 293T usando los vectores de empaquetamiento pCHGP-2, pCMV-Rev2, y pCMV-G.

Generación de líneas celulares que expresan CAR, Her2t y / o EGFRt

Para generar linfocitos T CD4 o CD8 de memoria central, se aislaron PBMC humanas sobre Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech) de kits de descarte de sangre de donantes sanos (Puget Sound Blood Center). Las PBMC de cada donante se dividieron en dos grupos (aislamiento de linfocitos T CD4 o CD8 de memoria central) y, posteriormente, se empobrecieron en AutoMACS usando kits de aislamiento de CD4 o CD8 y microperlas anti-CD45RA (Miltenyi Biotec), de acuerdo con el protocolo del fabricante. A continuación, la fracción empobrecida se seleccionó positivamente en AutoMACS usando microperlas anti-CD62L para producir linfocitos T CD4⁺CD45RO⁺CD62L⁺ o CD8⁺CD45RO⁺CD62L⁺

de memoria central. A continuación, las células aisladas se estimularon con 50 U/ml de interleuquina-2 (IL-2), 2 ng/ml de interleuquina-15 (IL-15), y perlas anti-CD3/CD28 (Life Technologies). Las líneas de linfocitos T primarios se transdujeron el día 3 después de activación usando sulfato de protamina (dilución 1:100) y un MOI viral de 1 seguido de centrifugación a 800 x g durante 45 minutos a 32 °C. Las demás líneas celulares se transdujeron de manera similar con un número de pases celulares bajo.

El subconjunto Her2⁺ o EGFR⁺ de cada línea celular se enriqueció mediante selección inmunomagnética con Herceptin o Erbitux conjugado con biotina y microperlas de anti-biotina (Miltenyi). Los linfocitos T CD19 o CD20CAR⁺ seleccionados se expandieron 12-18 días después de la transducción mediante estimulación con las TM-LCL irradiadas (8000 rad) a una relación de linfocitos T:TM-LCL de 1:7 en presencia de 50 U/ml de IL-2 y 2 ng/ml de IL-15. Los linfocitos T CD19CAR-T2A-Her2⁺/CD20CART2A-EGFR⁺ se clasificaron usando Herceptin biotinado y microperlas de multclasificación anti-biotina (Miltenyi) seguido de retirada de perlas, marcado celular con Erbitux-APC y microperlas anti-APC (Miltenyi).

Análisis proteico

La lisis celular se realizó en un cóctel inhibidor de proteasa que contenía tampón RIPA. Los lisados celulares se analizaron mediante el ensayo BCA (Pierce), cargado igualmente en geles y las transferencias de Western se sometieron a ensayo con los anticuerpos primarios Her2 y fosfo-Her2 (Cell Signaling Technology), anti CD247 (CD3 ζ), Herceptin biotinado o anti- β -actina (control de carga). Se añadió estreptavidina conjugada con colorante IR 800CW secundario o anti-ratón o conejo de cabra (LI-COR) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se obtuvieron imágenes de las transferencias en el sistema de formación de imágenes por infrarrojos Odyssey (LI-COR).

Ensayos de citotoxicidad, secreción de citoquinas y proliferación

Citotoxicidad: Se realizaron ensayos de liberación de cromo de cuatro horas como se describió anteriormente (Wang *et al.* 2011). La citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) se determinó usando hasta $2,5 \times 10^5$ células Tcm que expresan CD19CAR con marcador de Her2t, CD20CAR con marcador de EGFRt, CD19CAR-Her2t y CD20CAREGFRt, y CD19CAR con EGFRt como secuencia marcadora como células efectoras en cocultivos con 5×10^3 células K562 marcadas con Cr⁵¹ que expresan CD19 o CD20.

Secreción de citoquinas: se sembraron linfocitos T (5×10^5) por triplicado con células diana a una relación E:T de 2:1 en una placa de 96 pocillos y los sobrenadantes se analizaron mediante una matriz de perlas citométricas usando un panel de citoquinas humanas Bio-Plex (Bio-Rad), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Proliferación: se marcaron linfocitos T con éster de succinimidil-carboxifluoresceína 0,2 μ M (CFSE; Invitrogen), se lavaron y se sembraron por triplicado con células estimuladoras en medio sin citoquinas exógenas. Después de 72 horas de incubación, las células se marcaron con anti-CD3 y tinción vivas/muertas, y posteriormente se analizaron mediante citometría de flujo para evaluar la división celular de linfocitos CD3⁺ viables.

Injerto de linfocitos T *in vivo* y ADCC

Todos los experimentos con ratones fueron aprobados por el 0221 Animal Care and Use Committee del Seattle Children's Research Institute. Los ratones NOD/Scid IL2RyCnull se obtuvieron en The Jackson Laboratory o se criaron internamente.

Injerto: Se inyectaron por vía intravenosa ratones NOD/Scid IL2RyCnull de seis a 10 semanas de edad el día 0 con 10^7 linfocitos T negativos para Her2t/EGFRt (Simulado) o seleccionados para Her2t o EGFRt y por vía subcutánea con 5×10^6 células NS0-IL15 viables para proporcionar un suministro sistémico de IL-15 humana *in vivo*. La médula ósea se recogió de animales sacrificados 14 días después, y las suspensiones celulares se analizaron mediante citometría de flujo usando anti-CD45, vivo/muerto, CD4, CD8, Herceptin biotinado o Erbitux y estreptavidina-APC proporcionada por BD Biosciences. Alternativamente, los fémures se fijaron en formalina al 10 % durante 24 horas, se descalcificaron durante 2 horas (Richard-Allan Scientific) y se incrustaron en parafina para tinción inmunohistoquímica con anti-CD45 (DAKO), anti-EGFR (clon 31G7; Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, o Herceptin biotinado y SA-AF647 seguido de contratinción con Hoechst. Asimismo, las líneas celulares Her2⁺ o Her2t⁺ se adhirieron a portaobjetos usando poli-L-lisina y a continuación se tiñeron usando Herceptin biotinado y SA-AF647. Las imágenes fluorescentes se adquirieron usando el sistema de imágenes de Biomarcador Nuance FX.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron usando el software Prism (GraphPad). Los ensayos t de Student se realizaron como ensayos emparejados bilaterales con un intervalo de confianza de un 95 %, y los resultados con un valor *P* menor que 0,05 se consideraron significativos. Los análisis estadísticos de supervivencia se realizaron mediante ensayos de rango logarítmico y los resultados con un valor *P* menor que 0,05 se consideraron significativos.

Diseño y caracterización inicial de un epítipo de superficie multifuncional basado en ErbB2 humano (Her2)

El uso y la selección de productos homogéneos de células inmunitarias ha sido un factor limitante para el éxito clínico y la reproducibilidad de las estrategias de terapia adoptiva. Para ello, se diseñó un epítipo no inmunogénico basado en Her2 humano, denominado Her2t, como etiqueta genética candidata y herramienta para manipulación celular (Figura 1 panel A). Her2t carece de todos los componentes intracelulares de Her2, pero contiene la región transmembrana de Her2, un epítipo de unión conformacionalmente intacto reconocido por el anticuerpo monoclonal trastuzumab (Herceptin) y un GMCSFRss para facilitar la expresión superficial (Figura 1 panel B). Tres variantes del constructo Her2t, una conteniendo el Dominio IV de Her2 completo y dos epítopos conformacionales mínimos diseñados basándose en la estructura tridimensional de Her2 en complejo con Herceptin (Garrett *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 2003), se incorporaron inicialmente en el plásmido de empaquetamiento lentiviral ephIV7 y caracterizado en células CHO. El constructo Her2t que incluye los aminoácidos 563-652 destacados en la Figura 1 panel B mostró la mayor expresión superficial transitoria basándose en el análisis de flujo usando Herceptin biotinado y un fluoróforo conjugado con estreptavidina y, por lo tanto, se eligió para una caracterización posterior (datos no mostrados).

Her2t es una etiqueta genética viable y funcionalmente inerte

Después del análisis de expresión transitoria inicial, el ephIV7 que contiene Her2t se sometió a producción de lentivirus auto-inactivantes pseudotipados de VSV-g. El virus resultante se transdujo a continuación en múltiples tipos de células dando como resultado poblaciones de un 8,2-65 % de Her2t⁺ (datos no mostrados), (datos no mostrados), con células de eritroleucemia K562 transducidas (Her2t⁺ al 13,8 %) como representativo (Figura 2 panel A). Para evaluar la utilidad de Her2t como diana para el enriquecimiento selectivo de poblaciones de células dotadas de transgenes, la población de K562 transducidas se sometió a un proceso de purificación inmunomagnética de dos etapas usando Herceptin biotinado y microperlas de anti-biotina. Este proceso coherentemente dio como resultado poblaciones de células que eran ≥ 95 % de Her2t⁺ (Figura 2 panel B). Los experimentos de titulación posteriores revelaron que 1,2 ng o menos de Herceptin biotinado eran suficientes para marcar al máximo 10⁶ células Her2t⁺ (Figura 2 panel A).

Como se muestra en nuestro modelo molecular (Figura 1 panel A), Her2t carece de Dominios I-III extracelulares y contiene un epítipo de unión al Dominio IV necesario para reconocimiento de anticuerpos. Por lo tanto, se predijo que Her2t podría ser incapaz de unirse a anticuerpos comerciales de Her2 y Herceptin lo podría reconocer de forma única. Los análisis de flujo confirmaron que Herceptin podía reconocer y teñir eficazmente las células K562 que expresaban Her2t y Her2 completo, mientras que un anticuerpo comercial solo podía reconocer Her2 completo (Figura 2 panel C).

Los análisis de inmunotransferencia de Western para Her2t y Her2 completo se realizaron de manera similar en células que expresan Her2t⁺ seleccionado para Herceptin o Her2⁺ completo, respectivamente. Como se esperaba, cuando se usó un anticuerpo Her2 comercial, la proteína Her2 de 185 kDa completa solo se detectó en lisados de células que expresaban Her2 completo. Asimismo, la fosforilación de Her2 solo se detectó en lisados de células que expresaban Her2 completo que se trataron con neuregulina. Sólo se detectó una banda para Her2t en lisados de células Her2t⁺ cuando se sometieron a ensayo con Herceptin biotinado (Figura 2 panel D).

Her2t es un epítipo de selección muy riguroso y complementario para terapia con linfocitos T

Un epítipo de selección altamente eficaz para agentes terapéuticos de linfocitos T que expresan receptor antigénico quimérico (CAR), denominado EGFRt, se identificó previamente (Wang *et al.*, 2011). Se examinó si la expresión coordinada de Her2t en vectores virales que contienen CAR podría facilitar el uso clínico de terapias CAR de amplio alcance, diseñadas *ex vivo*. Además, Her2t diversifica el repertorio de marcadores de selección no inmunogénicos disponibles para terapias de linfocitos T redirigidos a CAR y puede actuar como una alternativa o complemento a las estrategias de selección de EGFRt (es decir, hacer que un linfocito T sea biespecífico frente a múltiples antígenos tumorales candidatos).

Para evaluar la utilidad de Her2t en la terapia con CAR, se construyó un constructo de ADN multidominio formado por el CD19CAR descrito previamente (Hudecek *et al.*, 2013) y una secuencia de T2A de omisión ribosómica para coexpresión directa con Her2t (Figura 1 panel C). El constructo CD19CAR-T2A-Her2t resultante se incorporó posteriormente en ephIV7 y se sometió a producción viral como se describió anteriormente.

Para evaluar la funcionalidad de Her2t como marcador de selección relativo o concertado con la expresión de EGFRt, se transdujeron linfocitos de memoria central (Tcm) CD4⁺ o CD8⁺ (Figura 3 panel A) un panel de CAR-T2A-Her2t y/o CAR-T2A-EGFRt que contenía vectores virales (Figura 3 panel B). Los Tcm CD4⁺ o CD8⁺ transducidos con un solo vector que contiene CAR fueron una selección preinmunomagnética de Her2t⁺ al 22-72 % o EGFRt⁺ usando Herceptin biotinado (Her2t) o Erbitux (EGFRt) y microperlas anti-biotina, pero se enriquecieron constantemente hasta una pureza uniforme (> 90 %) postselección (Figura 3 B). Las células transducidas Her2t⁺ y EGFRt⁺ dobles se clasificaron alternativamente por vía inmunomagnética usando una combinación de perlas de multiclasificación y anti-APC (Materiales y Métodos) dando como resultado >90 % de células positivas para transgén dobles (Figura 6).

Alternativamente, las líneas celulares de doble transducción pueden clasificarse usando biotina o estreptavidina libre como alternativa a la retirada de perlas. Dado que los análisis de intensidad de fluorescencia media de flujo (MFI) indicaron que las poblaciones de Tcm seleccionadas para Her2t podrían expresar niveles transgénicos más bajos con

respecto a las poblaciones seleccionadas para EGFRt (Figura 3 panel B), a continuación preguntamos si los niveles de Her2t se correlacionaban directamente con una menor expresión de CAR. Para hacer esto, se lisaron los Tcm que expresaban CD19CAR que se seleccionaron para Her2t o EGFRt y los lisados celulares se analizaron mediante análisis de transferencia de Western dirigido a CD3ζ. Los resultados demuestran que los transgenes añadidos a Her2t se seleccionan a un nivel de expresión más alto (por ejemplo, aproximadamente 2 veces) que los transgenes añadidos a EGFRt (Figura 3 panel C). Estos resultados indican que Her2t permite un proceso de selección más riguroso con respecto a la selección de EGFRt. El análisis de transferencia de Western también demostró la coexpresión de CD19CAR y CD20CAR en Tcm de doble selección (Figura 3 panel C).

Los Tcm de doble selección mantienen el fenotipo efector y la especificidad de diana *in vitro*

Múltiples tipos de cáncer regulan negativamente o mutan antígenos diana como medio para evadir la terapia. El direccionamiento simultáneo de múltiples antígenos asociados a tumores es, por lo tanto, un enfoque terapéutico prometedor para superar la evasión del tumor y puede ampliar el alcance terapéutico de las terapias de linfocitos T. Para evaluar si la coexpresión de dos CAR (CD19 y CD20-CAR) mediada por la selección del marcador de superficie (Her2t y EGFRt) podría mejorar los atributos funcionales de los linfocitos T redirigidos por CAR, se analizó la función *in vitro* de los Tcm que expresan CAR doble con respecto a sus homólogos únicos que expresan CAR. Los análisis de citotoxicidad mostraron que cada subconjunto de Tcm redirigidos por CAR (que expresan CD19-, CD20- o CD19- y CD20-CAR) confirió niveles similares de lisis específica frente a células K562 que expresan CD19, CD20 o ambos (Figura 4 panel A) pero no mediaron en el reconocimiento de las dianas K562 parentales CD19⁻/CD20⁻ (Figura 4 panel B).

La funcionalidad emparejada de los Tcm que expresan CAR doble frente a un panel de diana de K562 a continuación se sometió a ensayo (Figura 4 panel B) y demuestra que solo los Tcm que expresan CAR doble pudieron conferir lisis específica frente a todas las células K562 que expresan la diana. Por el contrario, los linfocitos Tcm que expresan CAR específico de CD19 o CD20 solo pudieron desencadenar actividad citolítica frente a células K562 que expresan sus antígenos diana afines (Figura 4 panel B).

El análisis cuantitativo de la producción de citoquinas como respuesta a la estimulación con el panel de diana de K562 demuestra una especificidad similar. Aunque ningún Tcm que expresaba CAR pudo producir citoquinas como respuesta al cocultivo con células parentales K562, los Tcm que expresan CAR doble produjeron IL2, IFNγ y TNFα como respuesta al cocultivo con todas las células que expresan diana y la producción de citoquinas se limitó a células diana K562/CD19-CD20 y K562/CD19 o K562/CD20 para Tcm que expresan CAR individual (Figura 4 panel C). Estos resultados indican que solo el Tcm que expresa CAR doble es biespecífico para CD19 y CD20 y media la activación y el direccionamiento de los linfocitos T tras el encuentro de cualquiera de los antígenos solo. Curiosamente, los Tcm que expresan CD19CAR seleccionado para Her2t produjeron un perfil de citoquinas más diverso y mejorado (por ejemplo, aproximadamente 2-3 veces mayor) con respecto a su homólogo seleccionado para EGFRt (Figura 3 panel D). Esto puede deberse a la naturaleza rigurosa de la selección de Her2t y la mejora resultante de la expresión de CAR total en los Tcm seleccionados para Her2t.

Dado que la actividad antitumoral de CAR se correlaciona con la proliferación y supervivencia de los linfocitos T transferidos, se decidió realizar un ensayo de dilución de CFSE para analizar la proliferación de Tcm modificados con CAR después de interacción con su respectiva diana(s). Se encontró que la expresión de CAR doble promovía la proliferación de Tcm después de estimulación a niveles similares a los Tcm que expresan CD19CAR.

Rastreo de linfocitos T Her2t⁺ transferidos adoptivamente mediante citometría de flujo e inmunohistoquímica

La mayoría de los ensayos clínicos de terapia con CAR hasta la fecha se han basado en técnicas basadas en PCR para cuantificar la persistencia de células modificadas genéticamente después de dosificación terapéutica. El uso de etiquetas genéticas específicas de terapia, tales como Her2t, puede permitir además el análisis fenotípico multiparamétrico e identificar subconjuntos de linfocitos T CAR infundidos que pueden correlacionarse con respuestas terapéuticas.

Para someter a ensayo la utilidad de Her2t como agente de rastreo *in vivo*, se recogieron muestras de médula ósea de ratones NOD/Scid IL-2RyC^{null} injertados con Tcm CD4 y CD8 CD19CAR⁺Her2t⁺ y las muestras procesadas se sometieron a análisis de citometría de flujo (Figura 5 panel A). Se encontraron niveles similares de injerto de linfocitos T CD45⁺ en ratones a los que se administraron células negativas para marcador, Her2t⁺, y EGFRt⁺ (Figura 5 panel B). Del subconjunto de linfocitos T CD45⁺, en un 11,7-45,7 % se hizo de tinción para CD8 indicando una expansión preferente de linfocitos T CD4⁺. Además, la cotinción para Her2t usando Herceptin biotinado y estreptavidina conjugada con APC permitió la resolución de linfocitos T Her2t⁺ de sus homólogos negativos para Her2t (Figura 5 panel C). Estos resultados demuestran que Her2t es un marcador de rastreo viable para linfocitos T transferidos adoptivamente.

A continuación, se determinó si Her2t era una diana viable para tinción inmunohistoquímica (IHC). Como estudio preliminar, se adhirieron células Her2t⁺ a portaobjetos y se tiñeron con Herceptin biotinado y estreptavidina conjugada con fluorocromo (Figura 5 panel D).

La unión de Herceptin a Her2t sensibiliza los linfocitos T humanos a ADCC

Incorporar un mecanismo de seguridad en linfocitos T administrados es una característica valiosa en caso de producirse un suceso clínico adverso durante la terapia. Se realizará un análisis de citotoxicidad *in vitro* de linfocitos T Her2t⁺ o EGFRt⁺ cuando se cocultivan con PBMC estimuladas con GM-CSF y Herceptin o Erbitux.

Se mezclaron células H9 (linfocitos T) (5×10^6 parentales, Her2t⁺, EGFRt⁺, o Her2t⁺/EGFRt⁺) y a continuación se sometieron a purificación (Figura 6). Las células se purificaron inicialmente basándose en Herceptin biotinada y perlas de multiclasificación anti-biotina. A continuación, las perlas de multiclasificación se retiraron y la fracción positiva se sometió posteriormente a purificación basándose en microperlas de Erbitux-APC y anti-APC. La fracción positiva final fue doble positiva para Her2t y EGFRt (Figura 6).

En este sistema, las PBMC estimuladas actuarán como fuente de efectores capaces de inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo en presencia de anticuerpos. El objetivo sería eliminar selectivamente las células Her2t⁺ o EGFRt⁺ cuando se añade al cocultivo Herceptin o Erbitux, respectivamente. Estos ensayos se expandirán *in vivo* usando Tcm ffluc⁺ que coexpresan Her2t o EGFRt. En esta situación, Tcm se injertarán en ratones NOD/Scid IL-2RyC^{null} seguido de la administración de Herceptin o Erbitux y PBMC recién activadas. El injerto *in vivo* y la eliminación mediada por anticuerpos de Tcm transferidos se medirán mediante formación de imágenes biofotónicas *in vivo*. La eliminación mediada por Herceptin o Erbitux debería ser específica para Tcm que expresen Her2t, EGFRt o ambos marcadores.

La selección combinada de Her2t y EGFRt confiere especificidad de CAR doble *in vivo*

El objetivo de estos experimentos es mostrar la actividad antitumoral selectiva *in vivo*. Las células tumorales K562 ffluc⁺ que son CD19⁺, CD20⁺ o CD19/CD20⁺ se establecerán mediante inyección s.c. en el costado izquierdo o derecho de ratones NOD/Scid IL-2RyC^{null}. Los Tcm que expresan CD19CAR-Her2t, CD19CAR-EGFRt, CD20CAR-EGFRt o CD19CAR-Her2t y CD20CAR se inyectarán por vía intravenosa después del establecimiento del tumor y la especificidad de los linfocitos T se determinará mediante imágenes biofotónicas. La pérdida de actividad de luciferasa tumoral (flujo total de fotones) indicará la regresión tumoral.

La regresión tumoral debería producirse para todas las dianas tumorales cuando los ratones se tratan con Tcm que expresan CAR doble, mientras que solo los tumores K562 que expresan CD19 o CD20 deberían revertir cuando los ratones se tratan con Tcm que expresan su CAR afin. Alternativamente, las células CD19⁺, CD20⁺ o CD19/CD20⁺K562 se establecerán como antes y se administrarán Tcm ffluc⁺CAR⁺ después del establecimiento tumoral. La localización de Tcm basándose en la especificidad de CAR se determinará mediante imágenes biofotónicas. Los linfocitos T Her2t⁺EGFRt⁺ de doble selección deberían localizarse en ambos costados del antígeno diana en los tumores K562, mientras que las células que expresan CD19 o CD20CAR deberían localizarse en su tumor K562 específico de antígeno diana.

La introducción de un dominio conector (Her2tG) entre el dominio IV y el dominio transmembrana de Her2 permite una unión mejorada al anticuerpo Herceptin

Como se muestra en la Figura 7, aparecen esquemas de la secuencia primaria de Her2t y Her2tG. Her2tG se diferencia de Her2t con la adición de una secuencia conectora entre el dominio IV y la región transmembrana de Her2 y comprende la secuencia GGGSGGGS (SEQ ID NO: 45) y el constructo se denomina Her2tG. Las células H9 se transdujeron con lentivirus a una MOI de 1 con Her2t o Her2tG. A continuación, las células transducidas se purificaron con Herceptin biotinada y microperlas anti-biotina de acuerdo con el protocolo de los fabricantes. Las poblaciones purificadas se tiñeron posteriormente para Her2t o Her2tG usando Herceptin biotinada y estreptavidina-PE. Los histogramas muestran una mayor unión a Her2tG (Figura 8). Como se muestra en la Figura 9, las células H9 se transdujeron con lentivirus a 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1 y 3 uL (de izquierda a derecha) y a continuación se analizaron para determinar la unión de Herceptin cinco días después. La variante de Her2t, Her2t(bisagra de CD28) pudo unirse a Herceptin a niveles similares a los del Her2t original (no se muestra la tinción de Her2t, pero se basa en la experiencia previa). Her2t(bisagra de IgG4) mejoró la unión de Herceptin con respecto a Her2t o Her2t(bisagra de CD28), mientras que la variante Her2tG tenía la mayor capacidad para unirse a Herceptin y teñir células H9 transducidas.

Como se muestra en los experimentos, un conector (SEQ ID NO: 45) entre el Dominio IV y el dominio transmembrana de Her2t condujo al constructo Her2tG. El conector se usa para inducir flexibilidad entre dominios proteicos. En otros ejemplos, el scFv de muchos CAR contiene cuatro subunidades G3S consecutivas colocadas entre los dominios Vh y VI del scFv de CAR. Esto permite flexibilidad en el plegamiento de los dos dominios scFv. Lo lógico aquí es que dos subunidades conectoras G3S podrían ser suficientes para poder inducir la misma cantidad de flexibilidad para Her2tG.

También se usaron dos subunidades conectoras G3S (SEQ ID NO: 45) para imitar la longitud del espaciador de la bisagra de CD28 y la bisagra de IgG4. Tanto la bisagra de CD28 como la bisagra de IgG4 se han usado como espaciadores entre el scFv y la región transmembrana en los CAR que son funcionales. Tanto la bisagra de CD28 como la bisagra de IgG4 contienen una cisteína que ayuda en la dimerización. Aunque es útil para los CAR, esta

dimerización puede inhibir la flexibilidad de Her2t y, por lo tanto, no permitir un reconocimiento tan significativo de Herceptin. La ventaja de usar dos conectores G3S (SEQ ID NO: 45) con respecto a tres o cuatro fue limitar la carga vectorial, eliminar secuencias potencialmente innecesarias y al mismo tiempo conseguir una funcionalidad mejorada.

- 5 Se describe un marcador de superficie celular multifinalidad denominado Her2t. Este nuevo marcador contiene solo 113 de los 1255 aminoácidos que componen Her2 de longitud completa y carece de todos los dominios intracelulares adicionales o responsables de la señalización celular Her2 intacta. Las células hematopoyéticas carecen de expresión de Her2, lo que convierte a Her2t en un marcador de selección transgénico candidato principal que, por diseño, se vuelve funcionalmente inerte pero capaz de refinar los linfocitos T del donante en productos terapéuticos homogéneos
- 10 que expresan transgén. El diseño de Her2t comprende la fusión del fragmento Her2t N-terminal con el péptido líder de la cadena α del receptor de GM-CSF humano. Esta fusión ayuda a facilitar la expresión de la superficie de Her2t y permite que el epítipo de unión mínimo sea reconocido únicamente por el anticuerpo monoclonal de calidad farmacéutica trastuzumab (Herceptin).
- 15 Se demostró que debido a su huella de ADNc mínima, Her2t puede expresarse solo o incorporarse coordinadamente en vectores lentivirales autoinactivantes junto con transgenes biológicamente activos, es decir, un receptor antigénico quimérico (CAR). Los niveles de expresión transgénica coordinada se alcanzaron añadiendo Her2t al CAR mediante un conector de salto ribosómico T2A y se verificaron mediante análisis de flujo y transferencia de Western de linfocitos T CD8 de memoria central purificados con Her2t. Además, también se demostró que Her2t es un epítipo de selección
- 20 altamente riguroso que, en comparación con las estrategias de selección de EGFRt, permite la selección *ex vivo* de linfocitos T con mayor expresión de CAR y producción de citoquinas efectoras. Esta característica puede ser ventajosa cuando se desean niveles de expresión transgénica más altos, como puede ser el caso cuando la terapia con CAR se expande al tratamiento de múltiples tipos de tumores.
- 25 Además de equipar los linfocitos T con niveles elevados de expresión transgénica, hacer que un linfocito T individual sea biespecífico contra múltiples antígenos tumorales puede resultar clínicamente beneficioso. De hecho, la regulación a la baja o la mutación de los antígenos diana se observa comúnmente en múltiples tipos de cáncer que requieren la implementación de estrategias más allá de la terapia dirigida por un solo CAR. En esta línea, se demostró que Her2t es un epítipo de selección complementario para EGFRt que, cuando cada epítipo de selección se une a un CAR,
- 30 puede facilitar la purificación de multiclasificación de linfocitos T que expresan CAR doble. La actividad citotóxica y la producción de citoquinas efectoras similares entre linfocitos T que expresan CAR individuales y dobles demuestran que la expresión individual o concertada de Her2t y EGFRt no da como resultado ningún deterioro funcional manifiesto.
- 35 Herceptin es susceptible de biotinación o conjugación química. Tal como se formula para uso comercial, Herceptin se reconstituye en H₂O de calidad clínica y retiene la unión de alta afinidad específica de Her2 después de biotinación. Esto, combinado con la disponibilidad de micropelotas anti-biotina de calidad cGMP (Miltenyi Biotec), permite la selección de células Her2t⁺ terapéuticamente relevantes en un dispositivo CliniMACS. Se demostró que un recuento celular tan bajo como un 13,8 % o para Her2t puede enriquecerse inmunomagnéticamente hasta > 90 % de pureza. Además, los resultados demuestran que Herceptin biotinado puede acoplarse a anticuerpos dirigidos contra
- 40 marcadores de linfocitos T para permitir el análisis fenotípico multiparamétrico y rastrear la distribución *in vivo* de linfocitos T que expresan CAR terapéuticos.
- 45 El alcance terapéutico de la inmunoterapia con CAR se está expandiendo rápidamente más allá de su éxito inicial con el tratamiento de tumores transmitidos por la sangre. Claramente se necesitan etiquetas genéticas alternativas que sean inherentemente no inmunogénicas, únicas para poblaciones de linfocitos T y altamente eficaces en la selección. Her2t engloba estas características mencionadas anteriormente y diversifica el repertorio de epítipos de selección que se usarán para terapia con CAR. Además, Her2t es un candidato principal para la selección concertada de agentes terapéuticos de CAR equipados con sistemas genéticos multiplexados.
- 50 Una ventaja de usar Her2t es su tamaño diminuto. Como tal, Her2t tiene la ventaja de empaquetarse eficazmente con constructos incluso más grandes. Para aprovechar el sistema, es preferente que el constructo tenga menos de 5 kb. En algunas alternativas, el tamaño del constructo es 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 14,9 Kb, o cualquier tamaño entre cualesquiera dos de los tamaños del constructo enumerados. El tamaño bajo es necesario ya que los constructos de más de 15 kb pueden correr el riesgo de tener titulaciones bajas.
- 55 Lo anterior es ilustrativo de la presente invención y no debe interpretarse como limitante de la misma. La invención se define mediante las siguientes reivindicaciones, con equivalentes de las reivindicaciones que se incluirán en la misma.

Tabla 1 CD19CAR

GMCSFRss

ADN: ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCCCACCCCGCC
AA: M L L L V T S L L L C E L P H P A

scFv CD19

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

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

ADN: AGCAAGTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCCACGGCACCGTCAAGCTG
AA: S K Y L N W Y Q Q K P D G T V K L

ADN: CTGATCTACCACACCAGCCGGCTGCACAGCGGCGTGCCAGCCGGTTTAGC
AA: L I Y H T S R L H S G V P S R F S

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

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

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

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

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

ADN: GTGAGCGGCGTGAGCCTGCCCCACTACGGCGTGAGCTGGATCCGGCAGCCC
AA: V S G V S L P D Y G V S W I R Q P

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

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

ADN: AAGAGCCAGGTGTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCC
AA: K S Q V F L K M N S L Q T D D T A

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

Bisagra de IgG4

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

CD28tm

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

ES 2 867 224 T3

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

41BB

ADN: GTG:AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTATG
AA: V K R G R K K L L Y I F K Q P F M

ADN: AGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCTCA
AA: R P V Q T T Q E E D G C S C R F P

CD3Zeta

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

ADN: GACGCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAATCAGCTGTACAACGAGCTGAAC
AA: D A P A Y Q Q G Q N Q L Y N E L N

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

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

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

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

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

T2A

ADN: CCAAGG:CTCGAGGGCGGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGT (SEQ ID NO: 46)

AA: P R L E G G G E G R G S L L T C G (SEQ ID NO: 2)

ADN: GACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGG (SEQ ID NO: 1)

Tabla 2 Uniprot P10747 CD28 (SEQ ID NO: 3)

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
MLRLLLALNL	FPSIQVTGNK	ILVKQSPMLV	AYDNAVNLSC	KYSYNLFSRE	FRASLHKGLD
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
SAVEVCVVYG	NYSQQQLQVYS	KTGFNCDGKL	GNESVTFYLQ	NLYVNQTDIY	FCKIEVMYPP
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
PYLDNEKSNG	TIIHVKGKHL	CPSPLFPGPS	KPFWVLVVVG	GVLACYSLLV	TVAFIIFWVR
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>		
SKRSRL	LLHSD	YMNMTPRRPG	PTRKHYQPYA	PPRDFAAYS	

1-18 péptido señal

19-152 dominio extracelular

153-179 dominio transmembrana

180-220 dominio intracelular

Posición 186-187 LL→GG

Tabla 3 Uniprot Q07011 4-1BB (SEQ ID NO: 4)

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
MGNSCYNIVA	TLLLVLNFER	TRSLQDPCSN	CPAGTFCDNN	RNQICSPCPP	NSFSSAGGQR
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
TCDICRQCKG	VFTRRKECSS	TSNAECDCTP	GFHCLGAGCS	MCEQDCKQGQ	ELTKKGCKDC
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
CFGTFNDQKR	GICRPWTNCS	LDGKSVLVNG	TKERDVVCGP	SPADLSPGAS	SVTPPAPARE
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
PGHSPQIISF	FLALTSTALL	FLLFFLTLLRF	SVVKRGRKKL	LYIFKQPFMR	PVQTTQEEDG
<u>250</u>					
CSCRFPEEEEE	GGCEL				

1-23 péptido señal

24-186 dominio extracelular

187-213 dominio transmembrana

214-255 dominio intracelular

Tabla 4 Uniprot P20963 isoforma 3 de CD3 ζ humano (SEQ ID NO: 5)

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
MKWKALFTAA	ILQAQLPITE	AQSFGLLDPK	LCYLLDGILF	IYGVILTALF	LRVKFSRSAD
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
APAYQQGQNQ	LYNELNLGRR	EEYDVLDKRR	GRDPEMGGKP	QRRKNPQEGE	YNELQKDKMA
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>		
EAYSEIGMKG	ERRRGKGDG	LYQGLSTATK	DTYDALHMQA	LPPR	

1-21 péptido señal

22-30 extracelular

31-51 transmembrana

52-164 dominio intracelular

61-89 ITAM1

100-128 ITAM2

131-159 ITAM3

Tabla 5 Secuencias de la región bisagra a modo de ejemplo

IgG1 humana EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 6)

IgG2 humana ERKCCVECP (SEQ ID NO: 7)

IgG3 humana ELKTPGLDTHTCPRCP (EPKSCDTTPPCPRCP)₃ (SEQ ID NO: 8)

IgG4 humana ESKYGPPCPSCP (SEQ ID NO: 9)

IgG4 humana modificada ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO: 10)

IgG4 humana modificada YGPPCPPCP (SEQ ID NO: 11)

IgG4 humana modificada KYGPPCPPCP (SEQ ID NO: 12)

IgG4 humana modificada EVVKYGPPCPPCP (SEQ ID NO: 13)

Tabla 6 Secuencia de ácidos nucleicos (SEQ ID NO: 14) y de aminoácidos (SEQ ID NO: 15) de Her2t

HER2t(CHP) Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos

```

M L L L V T S L L L C E L P H
ATGCT TCTCTGGTG ACAAGCCTC TCTCTGTGA GTTACCACAC
TAAGA AGAGGACCAC TGTTCCGAG ACGAGACACT CAATGGTGTG

P A F L L I P C H P E C Q P Q N G S V T C F G P E A D Q C V A C A H
CCAGCATGCC TCCTGATGCC ATGCCACCCCT GAGTGTGAGC CCCAGAAATGG CTCAGTGACC TGTTTTGGAC CGGAGGCTGA CCAGTGTGTG GCTGTGCCC
GGTCGTAAGG AGGACTAGGG TACGGTGGGA CTCACAGTGG GGGTCTTACC GAGTCACTGG ACAAAACCTG GCTCCGACT GGTACACAC CCGACACGGG

· Y K D P P F C V A R C P S G V K P D L S Y M P I W K F P D E E H G A ·
ACTATAAGGA CCTCCCTTC TGGGTGCCC GCTGCCCGAG CGGTGTGAAG CCTGACCTCT CCTACATGCC CATCTGGAGG TTTCAGATG ACGAGGGCGC
TGATATTCTT GGGAGGGAAG ACGACCCGGG CAGCGGGGTC GCCACACTTT GGAATGGAGA GGATGTACGG GTAGACCTTG AAGGTCTAC TCCTCCCGCG

· C Q P C P I N C T H S C V D L D D K G C P A E Q R A S P L T S I I
ATGCCAGCCT TGCCCCATCA ACTGCACCCA CTCCTGTGTG GACCTGGATG ACAAGGGCTG CCCCGCCGAG CAGAGAGCCA GCGCTCTGAC GTCCATCATC
TAGGTTCGGA ACGGGGTAGT TGACGTGGGT GAGGACACAC CTGACCTTAC TGTTCCGAG GGGCGGGCTC GTCTCTGGT CCGGAGACTG CAGGTAGTAG

S A V V G I L L V V V L G V V F G I L I *
TCTGCGGTGG TTGGATTCT GCTGGTGGT GTCTTGGGG TGGTCTTGG GATCTCATC TGA
AGACGCCACC AACCGTAAGA CGACCAGCAC CAGAACCACC ACCAGAAACC CTAGGAGTAG ACT

```

1-MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP-22 (**GMCSFRss**) (SEQ ID NO: 17)

563-CHPECQPQ NGSVTCFGPE **ADQ**CVACAHY **KDPPFC**VARC PSGVKPDLSYM
PIWKFPDEE GAC**Q**PCPINC THSCVDLDDK GCPAEQRASP LT 652

(restos de la secuencia de Her2 en negrita identificados como unión a Herceptin) (SEQ ID NO: 18)

653-SIISAVVGILLVVVLGVVFGILI-675 (SEQ ID NO: 19)

563-CHPECQPQ NGSVTCFGPE **ADQ**CVACAHY **KDPPFC**VARC PSGVKPDLSYM
PIWKFPDEE GAC**Q**PCPINC THSCVDLDDK GCPAEQRASP **LTSIISAVVG ILLVV**
VLGVV FGILI-675 (SEQ ID NO: 20)

Tabla 7 Nucleótidos (SEQ ID NO: 21) y Aminoácidos (SEQ ID NO: 22) de EGFRt

ADN: **ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTT**

AA: M L L L V T S L

ADN: **CTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCCTCCTGATCCCACGCAAAGTG**

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

ADN: **TGTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACTCACTCTCCATAAATGCT**

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

ADN: **ACGAATATTAAACACTTCAAAACTGCACCTCCATCAGTGGCGATCTCCAC**

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

ADN: **ATCCTGCCGGTGGCATTTAGGGGTGACTCCTTCACACATACTCCTCCTCTG**

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

ADN: **GATCCACAGGAACTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGGGTTT**

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

ADN: **TTGCTGATTTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCCTTTGAG**

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

ADN: **AACCTAGAAATCATACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTT**

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

ADN: **GCAGTCGTCAGCCTGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAG**

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

ADN: **ATAAGTGATGGAGATGTGATAATTTTCAGGAAACAAAAATTTGTGCTATGCA**

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

ADN: **AATACAATAAACTGGAAAAAACTGTTTGGGACCTCCGGTCAGAAAAACAAA**

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

ADN: **ATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGCTGCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGC**

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

ADN: **CATGCCTTGTGCTCCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCCGAGCCCAGGGACTGC**

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

ADN: **GTCTCTTGCCGGAATGTCAGCCGAGGCAGGGAATGCGTGGACAAGTGCAAC**

AA: V S C R N V S R G R E C V D K C N

ADN: **CTTCTGGAGGGTGAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGTGCATACAG**

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

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

ADN: **GGACCAGACAACTGTATCCAGTGTGCCCCTACATTGACGGCCCCCACTGC**
AA: G P D N C I Q C A H Y I D G P H C

ADN: **GTCAAGACCTGCCCCGGCAGGAGTCATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCTGG**
AA: V K T C P A G V M G E N N T L V W

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

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

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

ADN: **GTGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCATGTGA** (SEQ ID NO: 21)
AA: V A L G I G L F M * (SEQ ID NO: 22)

Tabla 8 Isoforma 1 de Her2 de longitud completa (Uniprot P04626-1) (SEQ ID NO: 23)

MELAALCRWG	LLLALLPPGA	ASTQVCTGTD	MKLRLPASPE	THLDMLRHLY	50
QGCQVVQGNL	ELTYLPTNAS	LSFLQDIQEV	QGYVLIAHNQ	VRQVPLQRLR	100
IVRGTQLFED	NYALAVLDNG	DPLNNTTPVT	GASPGGLREL	QLRSLTEILK	150
GGVLIQRNPQ	LCYQDTILWK	DIFHKNNQLA	LTLDITNRSR	ACHPCSPMCK	200
GSRCWGESSE	DCQSLTRTVC	AGGCARCKGP	LPTDCCHEQC	AAGCTGPKHS	250
DCLACLHFNH	SGICELHCPA	LVTYNTDTFE	SMPNPEGRYT	FGASCVTACP	300
YNYLSTDVGS	CTLVCPLHNQ	EVTAEDGTQR	CEKCSKPCAR	VCYGLGMEHL	350
REVRAVTSAN	IQEFAGCKKI	FGSLAFLPES	FDGDPASNTA	PLQPEQLQVF	400
ETLEEITGYL	YISAWPDSL	DLSVFQNLQV	IRGRILHNGA	YSLTLQGLGI	450
SWLGLRSLRE	LGSGLALHH	NTHLCFVHTV	PWDQLFRNPH	QALLHTANRP	500
EDECVGEGLA	CHQLCARGHC	WGPQPTQCVN	CSQFLRGQEC	VEECRVLQGL	550
PREYVNARHC	LPCHPECQPQ	NGSVTCFGPE	ADQCVACAHY	KDPFFCVARC	600
PSGVKPDLSY	MPIWKFPDEE	GACQPCPINC	THSCVDLDDK	GCPAEQRASP	650
LTSIISAVVG	ILLVVVLGVV	FGILIKRRQQ	KIRKYTMRRRL	LQETELVEPL	700
TPSGAMPNQA	QMRILKETEL	RKVKVLGSGA	FGTVYKGIWI	PDGENVKIPV	750
AIKVLRENTS	PKANKEILDE	AYVMAGVGSP	YVSRLLGICL	TSTVQLVTQL	800
MPYGCLLDHV	RENRRGLGSQ	DLNWCQMIA	KGMSYLEDVR	LVHRDLAARN	850
VLVKSPNHVK	ITDFGLARLL	DIDETEHYHAD	GGKVPIKWMA	LESILRRRFT	900
HQSDVWSYGV	TVWELMTFGA	KPYDGIPARE	IPDLLEKGER	LPQPPICTID	950
VYMIMVKCWM	IDSECRPRFR	ELVSEFSRMA	RDPQRFVVIQ	NEDLGPASPL	1000
DSTFYRSLLE	DDDMGDLVDA	EEYLVPQQGF	FCPDPAPGAG	GMVHHRHRSS	1050
STRSGGGDLT	LGLEPSEEEA	PRSPLAPSEG	AGSDVFDGDL	GMGAAKGLQS	1100
LPTHDPSPQL	RYSEDPTVPL	PSETDGYVAP	LTCSPQPEYV	NQPDVRPQPP	1150
SPREGPLPAA	RPAGATLERP	KTLSPGKNGV	VKDVFAFGGA	VENPEYLTPQ	1200
GGAAPQPHPP	PAFSPAFDNL	YYWDQDPPER	GAPPSTFKGT	PTAENPEYLG	1250
LDVPV					1255

1-22 péptido señal

23-652 dominio extracelular

653-675 dominio transmembrana

676-1255 citoplasmático

Tabla 9 Ácidos nucleicos (SEQ ID NO: 24) y polipéptidos (SEQ ID NO: 25) de CD20CAR
scFV CD20 NA

Atggagacagacacactcctgctatgggtgctgctgcttgggtccaggtccacaggtgacattgtgctgacccaatctccagcta
tcctgtctgcatctccaggggagaaggtcacaatgacttgcagggccagctcaagtgtaaattacatggactggtaccagaagaag
ccaggatcctcccccacccctggatttatgccacatccaacctggcttctggagtccctgctcgttcagtggtcagtggtctggga
cctcttactctctcacaatcagcagagtggaggctgaagatgctgccacttattactgccagcagtggtgagtttaaccacccacgtt
cggaggggggaccaagctggaaataaaaaggcagtactagcgggtgggtggtccggggcggttccgggtggggcggcagcagcg
aggtgcagctgcagcagcttggggctgagctggtgaagcctggggcctcagtggaagatgtcctgcaaggcttctggctacacattta
ccagttacaatatgcactgggtaaagcagacacctggacaggcctggaatggattggagctatttatccaggaaatggtgatact
tcctacaatcagaagttcaaaggcaaggccacattgactgcagacaaatcctccagcacagcctacatgcagctcagcagcctgac
atctgaggactctgcggactattactgtgcaagatctaattattacggtagtagctactggttcttcgatgtctggggcgaggacc
acggtcaccgtctctca

Bisagra de IgG4 (SEQ ID NO: 47)

Gagagcaagtacggaccgcccctgcccccttgcct

CH3 (SEQ ID NO: 48)

Ggccagcctcgagccccaggtgtacaccctgcctccctcccaggaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgcctggt
gaagggcttctacccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaacggccagcctgagaacaactacaagaccaccctcccggtg
ctggacagcgacggcagcttcttctgtacagccggctgaccgtggacaagagccggtggcaggaaggcaacgtcttttagctgcag
cgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacaccagaagagcctgagcctgtccctgggcaag

Proteína de scFV CD20 (SEQ ID NO: 25)

METDTLLLVVLLLVPGSTGDIVLTQSPAILSASPGEKVTMT**CRASSSV**
NYMDWYQKKPGSSPKPWY**ATSNLAS**GVPARFSGSGSGTSYSLTISRVE
AEDAATYY**CQQWSFNPT**FGGGTKLEIKGSTSGGGSGGGSGGGGSSEV
QLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFT**SYNMH**WVKQTPGQGLEWIG
AIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCAR
SNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSS

Bisagra de IgG4 (SEQ ID NO: 49)

ESKYGPPCPPCP

CH3 (SEQ ID NO: 50)

GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSLGK

El resto del constructo CD20CAR (CD28tm-41BB-zeta-T2A-EGFRt) es igual al constructo CD19CAR-T2A-EGFRt.

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> Seattle Children's Hospital dba Seattle Children's Research Institute Jensen, Michael C. Johnson, Adam	
5	<120> ETIQUETAS GENÉTICAS TRANSGÉNICAS Y MÉTODOS DE USO	
	<130> SCRI.066WO	
10	<150> 62/058.973 <151> 02-10-2014	
	<150> 61/977.751 <151> 10-04-2014	
15	<150> 61/986.479 <151> 30-04-2014	
20	<150> 62/089.730 <151> 09-12-2014	
	<150> 62/090.845 <151> 11-12-2014	
25	<150> 62/088.363 <151> 05-12-2014	
	<160> 50	
30	<170> FastSEQ para la Versión 4.0 de Windows	
	<210> 1 <211> 27 <212> ADN	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> ADN de CD19CAR que codifica una porción de la región bisagra de IgG4 modificada	
40	<400> 1 gacgtggagg agaatcccg ccctagg	27
	<210> 2 <211> 476 <212> PRT	
45	<213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> CD19 CAR	
50	<400> 2	

Met	Leu	Leu	Leu	Val	Thr	Ser	Leu	Leu	Leu	Cys	Glu	Leu	Pro	His	Pro
1				5					10					15	
Ala	Phe	Leu	Leu	Ile	Pro	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Thr	Thr	Ser	Ser
		20						25					30		
Leu	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser
		35					40					45			
Gln	Asp	Ile	Ser	Lys	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gly
		50					55				60				
Thr	Val	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	His	Thr	Ser	Arg	Leu	His	Ser	Gly	Val
65					70					75					80
Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr
			85						90					95	
Ile	Ser	Asn	Leu	Glu	Gln	Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln
			100					105					110		
Gly	Asn	Thr	Leu	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile
		115					120					125			
Thr	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Pro	Gly	Ser	Gly	Glu	Gly	Ser
		130					135					140			
Thr	Lys	Gly	Glu	Val	Lys	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Ala
145					150					155					160
Pro	Ser	Gln	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Val	Ser	Leu
				165					170					175	
Pro	Asp	Tyr	Gly	Val	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Arg	Lys	Gly	Leu
			180					185					190		
Glu	Trp	Leu	Gly	Val	Ile	Trp	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Ser
		195					200					205			
Ala	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ile	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln
		210				215					220				
Val	Phe	Leu	Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Thr	Asp	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr
225					230					235					240
Tyr	Cys	Ala	Lys	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr
				245					250					255	
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly
			260					265					270		
Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Met	Phe	Trp	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly
		275					280					285			
Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile
		290				295					300				
Phe	Trp	Val	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln
305					310					315					320
Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser
				325					330					335	
Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys
			340					345					350		
Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln
		355					360					365			
Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu
		370				375					380				
Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg
385					390					395					400
Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met
				405					410					415	
Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly
			420					425					430		
Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp
		435					440					445			
Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg	Leu	Glu	Gly
		450				455					460				
Gly	Gly	Glu	Gly	Arg	Gly	Ser	Leu	Leu	Thr	Cys	Gly				
465					470					475					

5 <210> 3
 <211> 180
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Dominio CD28

10 <400> 3

```

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

15 <210> 4
 <211> 240
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Dominio 4-1BB

<400> 4

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

<210> 5
<211> 164
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Isoforma 3 de CD3 Zeta humano
<400> 5

```

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

```

<210> 6
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Región bisagra de IgG1 humana
 <400> 6

```

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

```

<210> 7
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Región bisagra de IgG2 humana
 <400> 7

```

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

```

<210> 8
 <211> 61
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Región bisagra de IgG3 humana

<400> 8

Glu	Leu	Lys	Thr	Pro	Leu	Gly	Asp	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Arg	Cys	Pro
1				5					10				15		
Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Thr	Pro	Pro	Pro	Cys	Pro	Arg	Cys	Pro	Glu
		20					25					30			
Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Thr	Pro	Pro	Pro	Cys	Pro	Arg	Cys	Pro	Glu	Pro
		35					40					45			
Lys	Ser	Cys	Asp	Thr	Pro	Pro	Pro	Cys	Pro	Arg	Cys	Pro			
	50					55					60				

<210> 9
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Región bisagra de IgG4 humana
 <400> 9

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

<210> 10
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Región bisagra de IgG4 humana modificada
 <400> 10

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

<210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Región bisagra de IgG4 humana modificada
 <400> 11

Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro
1				5				

<210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Región bisagra de IgG4 humana modificada
 <400> 12

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

5 <210> 13
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Región bisagra de IgG4 humana modificada
 <400> 13

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

15 <210> 14
 <211> 408
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Her2t (proteína Her2 truncada)
 <400> 14

25 **atgcttctcc tggtgacaag ccttctgctc tgtgagttac cacaccacagc attcctcctg 60**
atcccatgcc accctgagtg tcagcccccag aatggctcag tgacctgttt tggaccggag 120
gotgaaccagt gtgtggcctg tgcccaactat aaggaccctc ccttctgcgt ggcccgctgc 180
cccagcgggtg tgaaacctga cctctcctac atgcccattct ggaagtttcc agatgaggag 240
ggcgcatgcc agccttgccc catcaactgc acccactcct gtgtggacct ggatgacaag 300
ggctgccccg ccgagcagag agccagccct ctgacgtcca tcatctctgc ggtgggttggc 360
attctgctgg tcgtggtctt ggggggtggtc tttgggatcc tcatctga 408

30 <210> 15
 <211> 135
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Her2t (proteína Her2 truncada)
 <400> 15

```

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

          115          120          125
Val Val Phe Gly Ile Leu Ile
          130          135

```

<210> 16
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Etiqueta genética sintética

<400> 16

```

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
 1           5           10           15
Ala Phe Leu Leu Ile Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly
          20           25           30
Ser Val Thr
          35

```

<210> 17
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia líder para localización de proteínas

<400> 17

```

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
 1           5           10           15
Ala Phe Leu Leu Ile Pro
          20

```

<210> 18
 <211> 90
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Fragmento de proteína Her2 reconocido por un anticuerpo antiHer2

<400> 18

```

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

```

5 <210> 19
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Fragmento de dominio transmembrana Her2, el dominio transmembrana de Her2
 <400> 19

```

Ser Ile Ile Ser Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly
 1      5      10      15
Val Val Phe Gly Ile Leu Ile Ile
      20

```

15 <210> 20
 <211> 113
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Dominio transmembrana Her2 como aminoácidos 653-675

25 <400> 20

```

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

```

30 <210> 21
 <211> 1074
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Que codifica un receptor del factor de crecimiento epidérmico truncado

5

<400> 21

```

atgcttctcc tgggtgacaag cttctctgctc tgtgagttac cacacccagc attcctcctg 60
atccacgcga aagtgtgtaa cgggaataggt attggtgaat ttaaagactc actctccata 120
aatgctacga atattaaaca cttcaaaaac tgcacctcca tcagtggcga tctccacatc 180
ctgccggtgg catttagggg tgactccttc acacatactc ctctctctga tccacaggaa 240
ctggatattc tgaaaaccgt aaaggaaatc acagggtttt tgctgattca ggcttggcct 300
gaaaacagga cggacctcca tgcctttgag aacctagaaa tcatacgccg caggaccaag 360
caacatggtc agttttctct tgcagtcgtc agcctgaaca taacatcctt gggattacgc 420
tccctcaagg agataagtga tggagatgtg ataatttcag gaaacaaaaa tttgtgctat 480
gcaaatacaa taaactggaa aaaactgttt gggacctccg gtcagaaaaa caaaattata 540
agcaacagag gtgaaaacag ctgcaaggcc acaggccagg tctgccatgc cttgtgctcc 600
cccgagggtc gctggggccc ggagcccagg gactgcgtct cttgccggaa tgtcagccga 660
ggcaggggat gcgtggacaa gtgcaacctt ctggagggtg agccaaggga gtttgtggag 720

aactctgagt gcatacagt ccacccagag tgctgctc aggccatgaa catcacctgc 780
acaggacggg gaccagacaa ctgtatccag tgtgccact acattgacgg cccccactgc 840
gtcaagacct gcccggcagg agtcatggga gaaaacaaca cctggtctg gaagtacgca 900
gacgcgggcc atgtgtgcca cctgtgccat ccaaactgca cctacggatg cactgggcca 960
ggtcttgaag gctgtccaac gaatggcct aagatccgt ccatcgccac tgggatgggtg 1020
ggggccctcc tcttgctgct ggtgggtggc ctggggatcg gcctcttcac gtga 1074

```

10

<210> 22

<211> 357

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Receptor del factor de crecimiento epidérmico truncado

<400> 22


```

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
 1          5          10          15
Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly
 20          25          30
Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe
 35          40          45
Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala
 50          55          60
Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu
 65          70          75          80
Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile
 85          90          95
Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu
 100         105         110
Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala
 115         120         125
Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu
 130         135         140
Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr
 145         150         155         160
Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys
 165         170         175
Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly
 180         185         190
Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu
 195         200         205
Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys
 210         215         220
Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu
 225         230         235         240
Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met
 245         250         255
Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala
 260         265         270
His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val
 275         280         285
Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His
 290         295         300
Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro
 305         310         315         320
Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala
 325         330         335
Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly
 340         345         350
Ile Gly Leu Phe Met
 355

```

<210> 23
 <211> 1255
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Isoforma 1 humana de Her2 de longitud completa

<400> 23

```

Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu
 1          5          10          15
Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys
 20          25          30
Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His
 35          40          45
Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr
 50          55          60
Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val
 65          70          75          80
Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu
 85          90          95
Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr
 100          105          110
Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro
 115          120          125
Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser
 130          135          140
Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln
 145          150          155          160
Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn
 165          170          175
Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys
 180          185          190
His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser
 195          200          205
Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys
 210          215          220
Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys
 225          230          235          240
Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu
 245          250          255
His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val
 260          265          270
Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg
 275          280          285
Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu
 290          295          300
Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln
 305          310          315          320
Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys
 325          330          335
Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu
 340          345          350
Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys
 355          360          365
Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp
 370          375          380
Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe
 385          390          395          400
Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro
 405          410          415
Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg

```

			420						425						430			
Gly	Arg	Ile	Leu	His	Asn	Gly	Ala	Tyr	Ser	Leu	Thr	Leu	Gln	Gly	Leu			
		435					440					445						
Gly	Ile	Ser	Trp	Leu	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Glu	Leu	Gly	Ser	Gly			
	450					455					460							
Leu	Ala	Leu	Ile	His	His	Asn	Thr	His	Leu	Cys	Phe	Val	His	Thr	Val			
465						470				475						480		
Pro	Trp	Asp	Gln	Leu	Phe	Arg	Asn	Pro	His	Gln	Ala	Leu	Leu	His	Thr			
						485			490					495				
Ala	Asn	Arg	Pro	Glu	Asp	Glu	Cys	Val	Gly	Glu	Gly	Leu	Ala	Cys	His			
			500					505					510					
Gln	Leu	Cys	Ala	Arg	Gly	His	Cys	Trp	Gly	Pro	Gly	Pro	Thr	Gln	Cys			
		515					520					525						
Val	Asn	Cys	Ser	Gln	Phe	Leu	Arg	Gly	Gln	Glu	Cys	Val	Glu	Glu	Cys			
	530					535					540							
Arg	Val	Leu	Gln	Gly	Leu	Pro	Arg	Glu	Tyr	Val	Asn	Ala	Arg	His	Cys			
545					550				555						560			
Leu	Pro	Cys	His	Pro	Glu	Cys	Gln	Pro	Gln	Asn	Gly	Ser	Val	Thr	Cys			
					565				570					575				
Phe	Gly	Pro	Glu	Ala	Asp	Gln	Cys	Val	Ala	Cys	Ala	His	Tyr	Lys	Asp			
			580					585					590					
Pro	Pro	Phe	Cys	Val	Ala	Arg	Cys	Pro	Ser	Gly	Val	Lys	Pro	Asp	Leu			
		595					600					605						
Ser	Tyr	Met	Pro	Ile	Trp	Lys	Phe	Pro	Asp	Glu	Glu	Gly	Ala	Cys	Gln			
	610					615					620							
Pro	Cys	Pro	Ile	Asn	Cys	Thr	His	Ser	Cys	Val	Asp	Leu	Asp	Asp	Lys			
625					630					635					640			
Gly	Cys	Pro	Ala	Glu	Gln	Arg	Ala	Ser	Pro	Leu	Thr	Ser	Ile	Ile	Ser			
					645				650					655				
Ala	Val	Val	Gly	Ile	Leu	Leu	Val	Val	Val	Leu	Gly	Val	Val	Phe	Gly			
			660					665					670					
Ile	Leu	Ile	Lys	Arg	Arg	Gln	Gln	Lys	Ile	Arg	Lys	Tyr	Thr	Met	Arg			
		675					680					685						
Arg	Leu	Leu	Gln	Glu	Thr	Glu	Leu	Val	Glu	Pro	Leu	Thr	Pro	Ser	Gly			
	690					695				700								
Ala	Met	Pro	Asn	Gln	Ala	Gln	Met	Arg	Ile	Leu	Lys	Glu	Thr	Glu	Leu			
705					710					715					720			
Arg	Lys	Val	Lys	Val	Leu	Gly	Ser	Gly	Ala	Phe	Gly	Thr	Val	Tyr	Lys			
					725				730					735				
Gly	Ile	Trp	Ile	Pro	Asp	Gly	Glu	Asn	Val	Lys	Ile	Pro	Val	Ala	Ile			
			740					745					750					
Lys	Val	Leu	Arg	Glu	Asn	Thr	Ser	Pro	Lys	Ala	Asn	Lys	Glu	Ile	Leu			
	755					760					765							

```

Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro
 930                      935                      940
Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met
 945                      950                      955                      960
Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe
                      965                      970                      975
Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu
                      980                      985                      990
Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu
 995                      1000                      1005
Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr Leu
 1010                      1015                      1020
Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly Ala Gly
 1025                      1030                      1035                      1040
Gly Met Val His His Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg Ser Gly Gly
                      1045                      1050                      1055
Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu Glu Ala Pro Arg
 1060                      1065                      1070
Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser Asp Val Phe Asp Gly
 1075                      1080                      1085
Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu Gln Ser Leu Pro Thr His
 1090                      1095                      1100
Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu
 1105                      1110                      1115                      1120
Pro Ser Glu Thr Asp Gly Tyr Val Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln
                      1125                      1130                      1135
Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro
 1140                      1145                      1150
Arg Glu Gly Pro Leu Pro Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu
 1155                      1160                      1165
Arg Pro Lys Thr Leu Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val
 1170                      1175                      1180
Phe Ala Phe Gly Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln
 1185                      1190                      1195                      1200
Gly Gly Ala Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala
                      1205                      1210                      1215
Phe Asp Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala
 1220                      1225                      1230
Pro Pro Ser Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr
 1235                      1240                      1245
Leu Gly Leu Asp Val Pro Val
 1250                      1255

```

<210> 24

<211> 798

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Receptor antigénico quimérico de ADN de CD20CAR

10

<400> 24

```

atggagacag acacactcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ttccacaggt 60
gacattgtgc tgacccaatc tccagctatc ctgtctgcat ctccagggga gaaggtcaca 120
atgacttgca gggccagctc aagtgtaaat tacatggact ggtaccagaa gaagccagga 180
tcctcccca aaccctggat ttatgccaca tccaacctgg cttctggagt ccctgctcgc 240
ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcaca tcagcagagt ggaggctgaa 300
gatgctgcca cttattactg ccagcagtg agttttaatc caccacgtt cggagggggg 360
accaagctgg aaataaaagg cagtactagc ggtgggtggc cggggggcgg ttccgggggg 420
ggcggcagca gcgaggtgca gctgcagcag tctggggctg agctggtgaa gcctggggcc 480
tcagtgaaga tgtcctgcaa ggcttctggc tacacattta ccagttacaa tatgcactgg 540
gtaaagcaga cacctggaca gggcctggaa tggattggag ctatttatcc aggaaatggg 600

gatacttcct acaatcagaa gttcaaaggc aaggccacat tgactgcaga caaatcctcc 660
agcacagcct acatgcagct cagcagcctg acatctgagg actctgcgga ctattactgt 720
gcaagatcta attattacgg tagtagctac tggttcttcg atgtctgggg cgcagggacc 780
acggtcacog tctcctca                                     798

```

<210> 25
 <211> 266
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético de CD20CAR

<400> 25

```

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1          5          10          15
Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser
          20          25          30
Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser
          35          40          45
Val Asn Tyr Met Asp Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys
 50          55          60
Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg
 65          70          75          80
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg
          85          90          95
Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe
          100          105          110
Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Ser
          115          120          125
Thr Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ser
          130          135          140
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
          145          150          155          160
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
          165          170          175
Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
          180          185          190
Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
          195          200          205
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
          210          215          220
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Asp Tyr Tyr Cys
          225          230          235          240
Ala Arg Ser Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp Phe Phe Asp Val Trp
          245          250          255
Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
          260          265

```

<210> 26
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Conector T2A de autoescisión

<400> 26

```

Leu Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly
 1          5          10          15

```

<210> 27
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cadena ligera variable que comprende una CDRL1

<400> 27

		Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Ser	Lys	Tyr	Leu	Asn					
		1				5					10						
5	<210> 28																
	<211> 7																
	<212> PRT																
	<213> Secuencia Artificial																
	<220>																
	<223> Cadena ligera variable que comprende una CDRL2																
10	<400> 28																
		Ser	Arg	Leu	His	Ser	Gly	Val									
		1				5											
15	<210> 29																
	<211> 9																
	<212> PRT																
	<213> Secuencia Artificial																
	<220>																
20	<223> Cadena ligera variable que comprende una CDRL3																
	<400> 29																
		Gly	Asn	Thr	Leu	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly							
		1				5											
25	<210> 30																
	<211> 5																
	<212> PRT																
	<213> Secuencia Artificial																
30	<220>																
	<223> Cadena pesada variable que comprende una CDRH1																
	<400> 30																
		Asp	Tyr	Gly	Val	Ser											
		1				5											
35	<210> 31																
	<211> 16																
	<212> PRT																
40	<213> Secuencia Artificial																
	<220>																
	<223> Cadena pesada variable que comprende una CDRH2																
45	<400> 31																
		Val	Ile	Trp	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Lys	Ser
		1				5					10					15	
50	<210> 32																
	<211> 5																
	<212> PRT																
	<213> Secuencia Artificial																

<220>
 <223> Cadena pesada variable que comprende una CDRH3

5 <400> 32

Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5

10 <210> 33
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Cadena ligera variable que comprende una CDRL1

<400> 33

Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met Asp
 1 5 10

20 <210> 34
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Cadena ligera variable que comprende una CDRL2

<400> 34

30 <210> 35
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Cadena ligera variable que comprende una CDRL3

40 <400> 35

Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr
 1 5

45 <210> 36
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Cadena pesada variable que comprende una secuencia de CDRH1, una secuencia humanizada o humana sintética

55 <400> 36

Ser Tyr Asn Met His
1 5

5 <210> 37
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> CDRH2, cadena pesada variable que comprende una secuencia humanizada o humana sintética

<400> 37

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15
Gly

15 <210> 38
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Cadena pesada variable que comprende CDRH3, una secuencia humanizada o humana sintética

<400> 38

Ser Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp Phe Phe Asp Val
1 5 10

25 <210> 39
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Aminoácidos conectores flexibles

35 <400> 39

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

40 <210> 40
 <211> 429
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Dominio IV de Her2 y conector de aminoácidos 7

<400> 40

```

atgcttctcc tgggtgacaag ccttctgctc tgtgagttac cacacccagc attcctcctg 60
atcccatgcc accctgagtg tcagccccag aatgggtcag tgacctgttt tggaccggag 120
gctgaccagt gtgtggcctg tgccactat aaggaccctc ccttctgcgt ggcccgctgc 180
cccagcggtg tgaacctga cctctcctac atgcccatct ggaagtttcc agatgaggag 240

ggcgcacatgcc agccttgccc catcaactgc acccactcct gtgtggacct ggatgacaag 300
ggctgccccg ccgagcagag agccagcccc ttaacgggtg gaggcagcgg aggtggctcc 360
atcatctctg cgggtggttg cattctgctg gtcgtggtct tgggggtggt ctttgggata 420
ctcatctga                                     429

```

<210> 41
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Dominio IV de Her2 y conector de aminoácidos 7

<400> 41

```

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

```

<210> 42
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Bucle 1 de la proteína Her2, región proteica, proteína humana

<400> 42

```

Glu Ala Asp Gln Cys
 1           5

```

<210> 43
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Bucle 2 de la proteína Her2, región proteica, proteína humana

<400> 43

Asp Pro Pro Phe
1

5

<210> 44

<211> 10

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Bucle 3 de la proteína Her2, región proteica, proteína humana

15

<400> 44

Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro
1 5 10

<210> 45

20

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25

<223> Conector sintético

<400> 45

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5

30

<210> 46

<211> 1428

<212> ADN

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CD19 CAR

40

<400> 46

```

atgctgctgc tgggtgaccag cctgctgctg tgcgagctgc cccaccccgc ctttctgctg 60
atccccgaca tccagatgac ccagaccacc tccagcctga ggcgcagcct gggcgaccgg 120
gtgaccatca gctgccgggc cagccaggac atcagcaagt acctgaactg gtatcagcag 180
aagccccgacg gcaccgtcaa gctgctgctg taccacacca gccggctgca cagcggcgtg 240
cccagccgggt ttagcggcag cggctccggc accgactaca gcctgaccat ctccaacctg 300
gaacaggaag atatcgccac ctacttttgc cagcagggca acacactgcc ctacaccttt 360
ggcggcggaa caaagctgga aatcacccgc agcacctccg gcagcggcaa gcctggcagc 420
ggcgagggca gcaccaaggg cgaggtgaag ctgcaggaaa ggcggccctgg cctggtggcc 480
cccagccaga gcctgagcgt gacctgcacc gtgagcggcg tgagcctgcc cgactacggc 540
gtgagctgga tccggcagcc cccaggaag ggcctggaat ggctgggctg gatctggggc 600
agcgagacca cctactacaa cagcgccctg aagagccggc tgacctcat caaggacaac 660
agcaagagcc aggtgttctt gaagatgaac agcctgcaga ccgacgacac cgccatctac 720
tactgcgcca agcactacta ctacggcggc agctacgcca tggactactg gggccagggc 780
accagcgtga ccgtgagcag cgagagcaag tacggaccgc cctgcccccc ttgcctatg 840
ttctgggtgc tgggtggtggt cggaggcgtg ctggcctgct acagcctgct ggtcacctg 900
gccttcatca tcttttgggt gaaacggggc agaaagaaac tcctgtatat attcaaaca 960
ccatttatga gaccagtaca aactactcaa gaggaagatg gctgtagctg ccgatttcca 1020
gaagaagaag aaggaggatg tgaactgcgg gtgaagttca gcagaagcgc cgacgcccct 1080
gcctaccagc agggccagaa tcagctgtac aacgagctga acctgggcag aagggaagag 1140
tacgacgtcc tggataagcg gagaggccgg gacctgaga tgggcggcaa gcctcggcgg 1200
aagaaccccc aggaaggcct gtataacgaa ctgcagaaag acaagatggc cgaggcctac 1260
agcgagatcg gcatgaaggg cgagcggagg cggggcaagg gccacgacgg cctgtatcag 1320
ggcctgtcca ccgccacca ggatacctac gacgcctgc acatgcaggc cctgccccca 1380
aggctcgagg gcggcggaga gggcagagga agtcttctaa catgcggt 1428

```

<210> 47
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Bisagra de IgG4

<400> 47
 gagagcaagt acggaccgcc ctgccccct tgcctt 36

<210> 48
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Región bisagra de CH3

<400> 48

```

ggccagcctc gcgagcccca ggtgtacacc ctgcctccct ccaggaaga gatgaccaag 60
aaccaggtgt ccctgacctg cctggtgaag ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 120
tgggagagca acggccagcc tgagaacaac tacaagacca ccctcccggt gctggacagc 180
gacggcagct tcttctgtgta cagccggctg accgtggaca agagccggtg gcaggaaggc 240
aacgtcttta gctgcagcgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagagc 300
ctgagcctgt ccctgggcaa g

```

<210> 49
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Bisagra de IgG4

<400> 49

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

5

<210> 50
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10

<220>
<223> Región bisagra de CH3

15

<400> 50

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

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado, que comprende al menos un 95 % de identidad de secuencia con un dominio extracelular de polipéptido HER2 que tiene los aminoácidos 563 a 652 de SEQ ID NO: 23, en donde el polipéptido aislado está unido a un dominio transmembrana, que comprende los aminoácidos 653-675 de SEQ ID NO: 23, en donde el polipéptido aislado comprende además un dominio conector que comprende la secuencia presentada en SEQ ID NO: 45, en donde el polipéptido aislado se une específicamente a un anticuerpo que se une a un epítipo en el Dominio IV de Her2, y en donde el polipéptido aislado excluye el Dominio I de Her2, aminoácidos 23-217 de SEQ ID NO: 23, Dominio II, aminoácidos 218-341 de SEQ ID NO: 23, Dominio III, aminoácidos 342-510 de SEQ ID NO: 23, y dominios intracelulares.
2. El polipéptido aislado de la reivindicación 1, en donde el polipéptido HER2 comprende los aminoácidos ácido glutámico 580, ácido aspártico 582, ácido aspártico 592, fenilalanina 595, y glutamina 624 de SEQ ID NO: 23, los aminoácidos 563-652 de SEQ ID NO: 23, o los aminoácidos 653-675 de SEQ ID NO: 23.
3. El polipéptido aislado de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende además un péptido líder que proporciona expresión en la superficie celular, tal como un péptido líder que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 17.
4. El polipéptido aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el anticuerpo se une a un receptor Her2.
5. Un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
6. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 5 que comprende además un promotor o transgén.
7. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 6, en donde el transgén comprende un polinucleótido que codifica un receptor antigénico quimérico.
8. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 7, en donde dicho receptor antigénico quimérico comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio espaciador, un dominio transmembrana, y al menos un dominio estimulador, opcionalmente, en donde dicho polinucleótido que codifica dicho transgén está unido al ácido nucleico que codifica el polipéptido HER2 de la reivindicación 1 con un conector de autoescisión, tal como un conector T2A que tiene la secuencia LEGGGEGRGSLLTCG (SEQ ID NO: 26).
9. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 7, en donde el receptor antigénico quimérico comprende la secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 25.
10. Una célula hospedadora aislada que expresa el polipéptido aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o el ácido nucleico aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 5-8, en donde la célula hospedadora se selecciona entre el grupo que consiste en un linfocito T CD8, un linfocito T CD4, un linfocito T CD4 sin activación previa, un linfocito T CD8 sin activación previa, un linfocito CD8 de memoria central, y linfocitos CD4 de memoria central.
11. La célula hospedadora aislada de la reivindicación 10, en donde la célula hospedadora comprende un segundo ácido nucleico que codifica un segundo receptor antigénico quimérico y una segunda etiqueta genética.
12. La célula hospedadora aislada de la reivindicación 11, en donde el segundo receptor antigénico quimérico comprende la secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 25 o SEQ ID NO: 2.
13. La célula hospedadora aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en donde la célula hospedadora es autóloga, es específica de antígeno, un linfocito T precursor, una célula madre hematopoyética o un linfocito T precursor.
14. La célula hospedadora aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, para uso para tratar un cáncer que tiene un antígeno tumoral reconocido por el receptor o receptores antigénicos quiméricos en las células.
15. La célula hospedadora aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, para uso para tratar un cáncer que tiene un antígeno tumoral reconocido por el receptor o receptores antigénicos quiméricos en las células y un anticuerpo que se une específicamente a la etiqueta o etiquetas genéticas.
16. La célula hospedadora aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, para uso para tratar un cáncer de la reivindicación 15, en donde el anticuerpo está conjugado con un agente citotóxico, y/o el anticuerpo está marcado de forma detectable.
17. La célula hospedadora aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, para uso para tratar un cáncer de la reivindicación 15, en donde dicho anticuerpo es Herceptin o Erbitux.

FIG. 1A

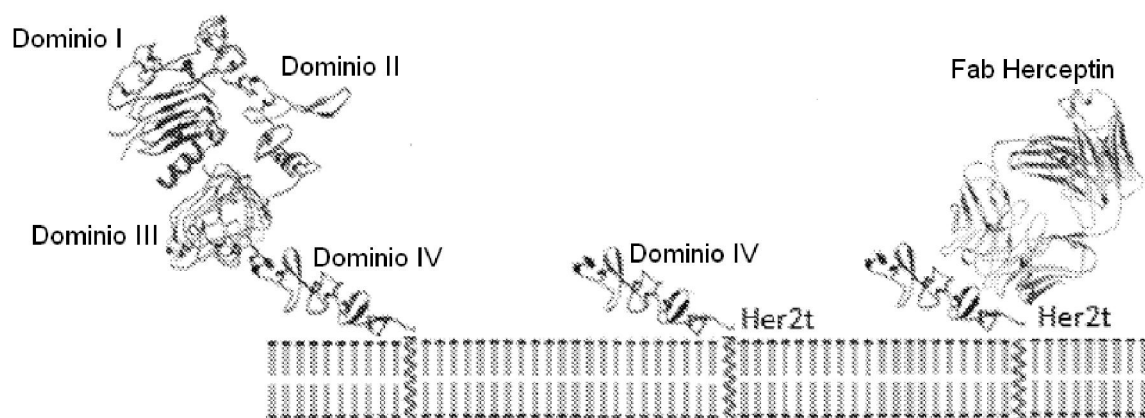


FIG. 1B

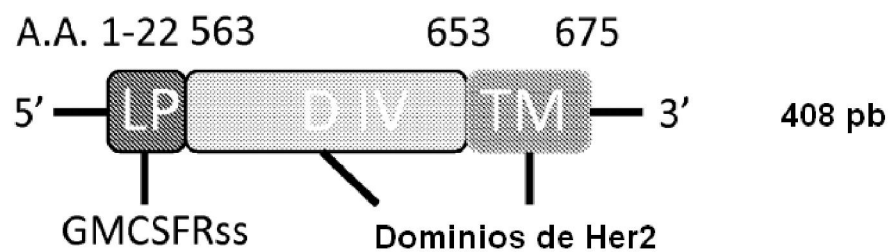


FIG. IC

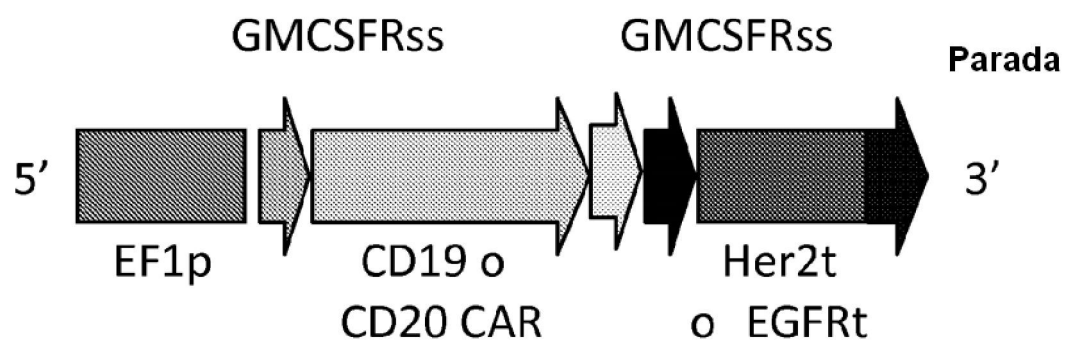


FIG. 2A

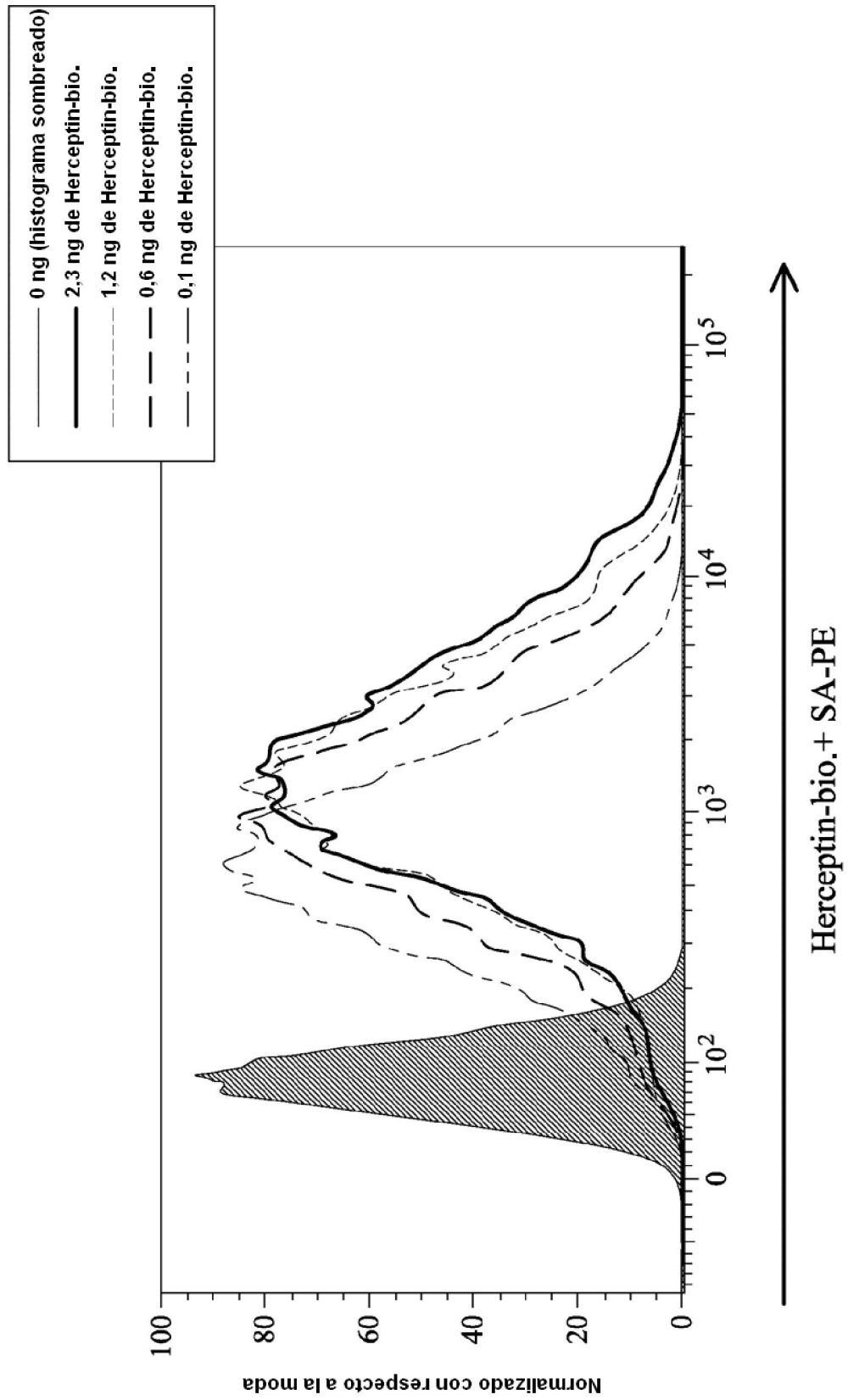


FIG. 2B

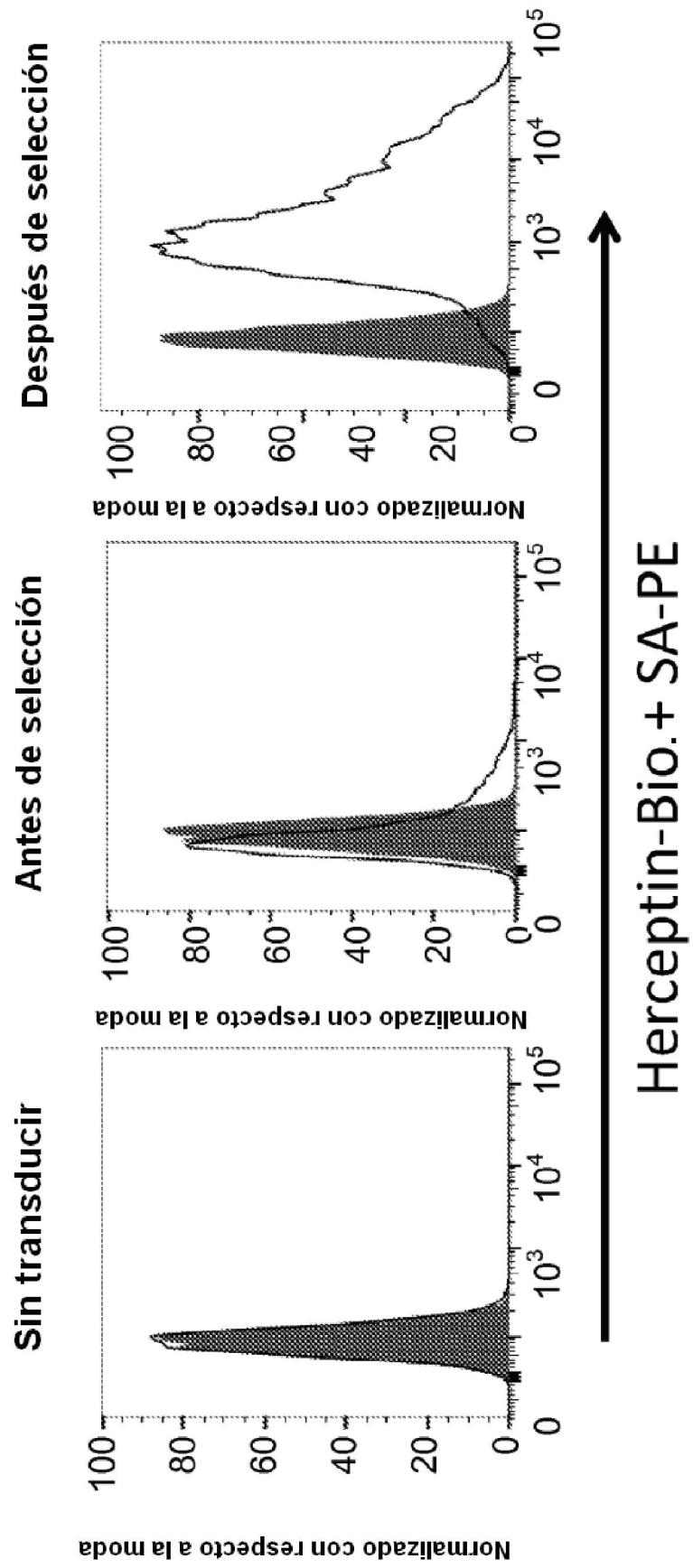


FIG. 2C

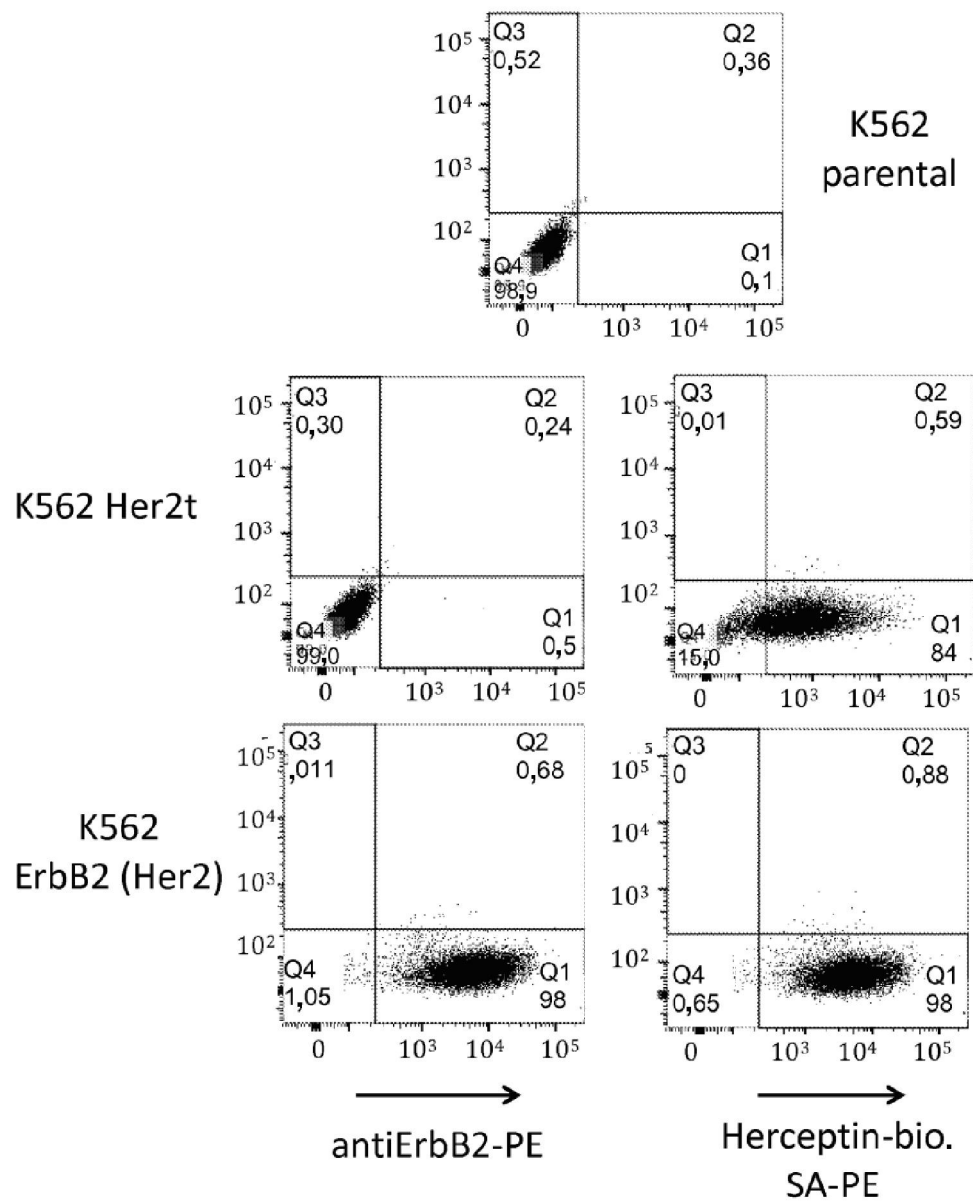


FIG. 2D

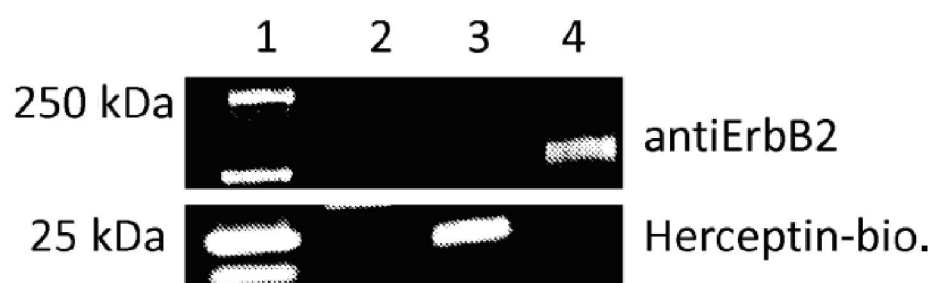


FIG. 3A

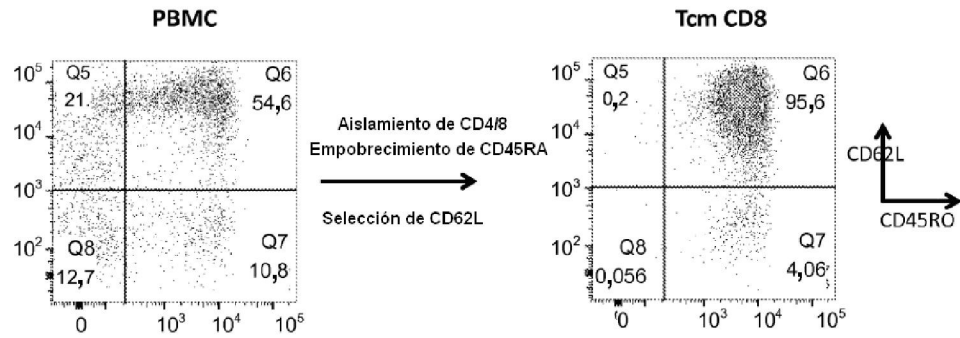


FIG. 3B

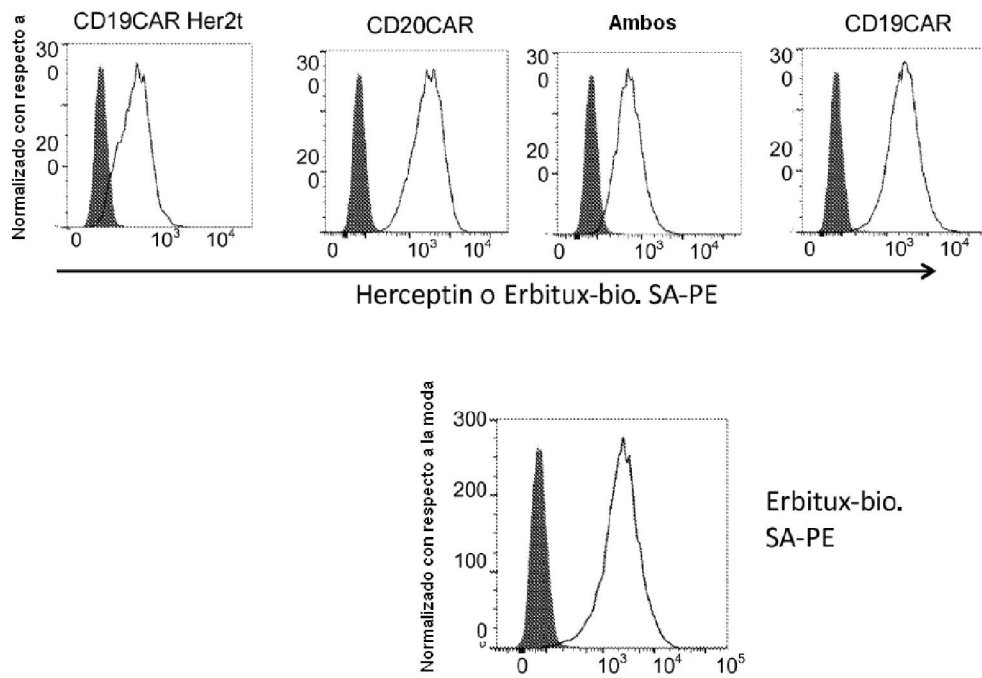


FIG. 3C

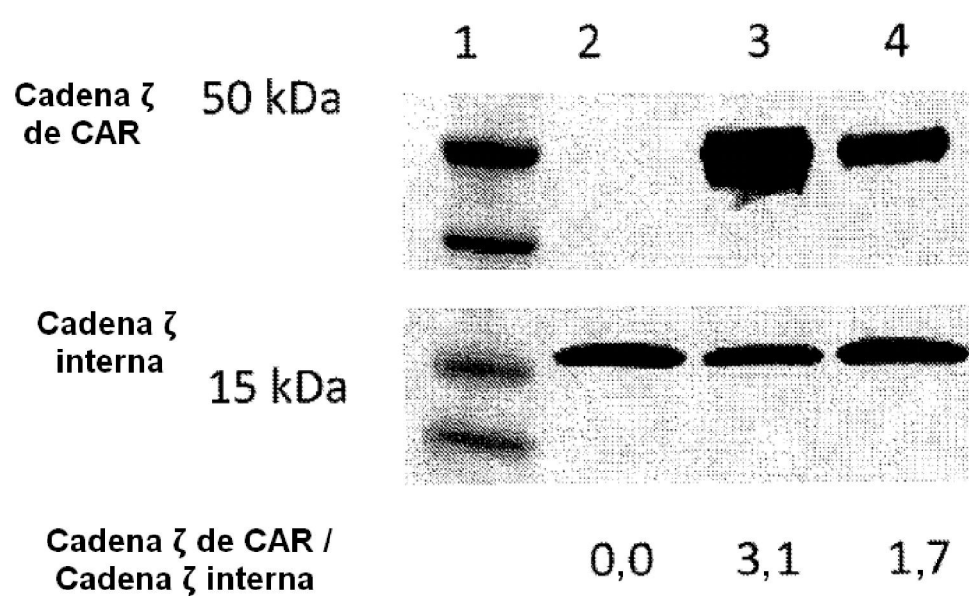


FIG. 4A

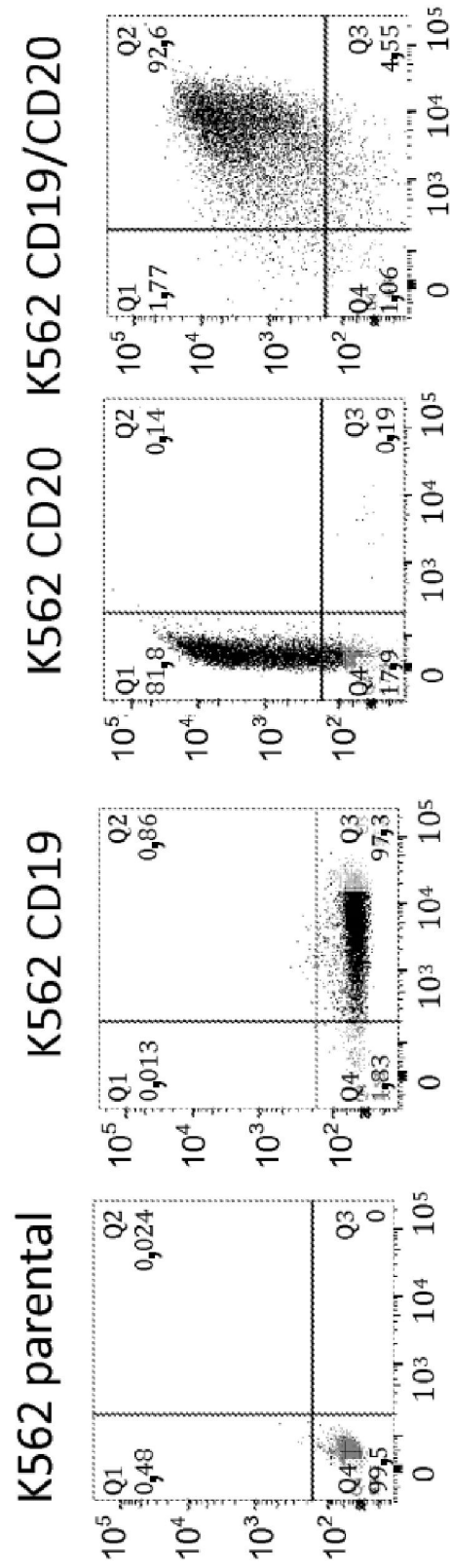


FIG. 4B

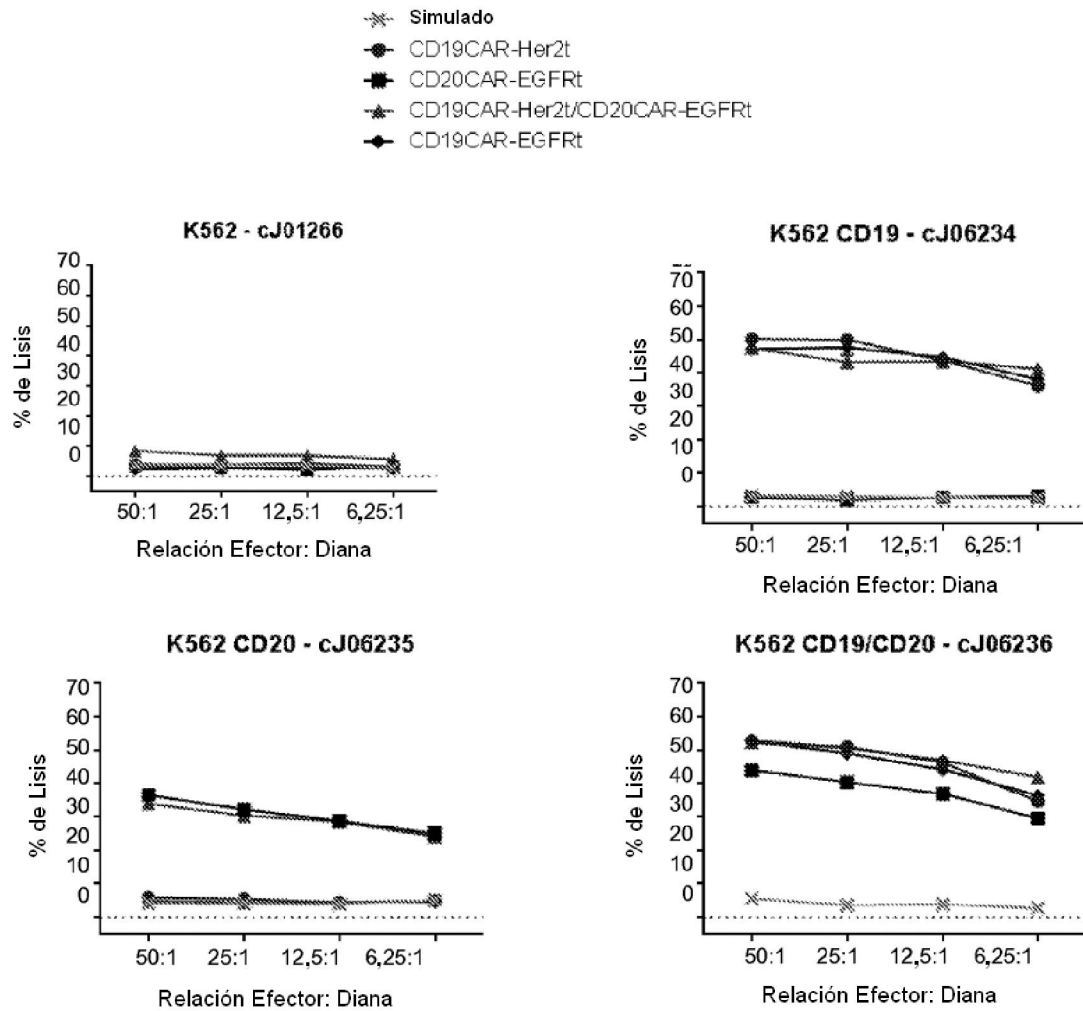


FIG. 4C

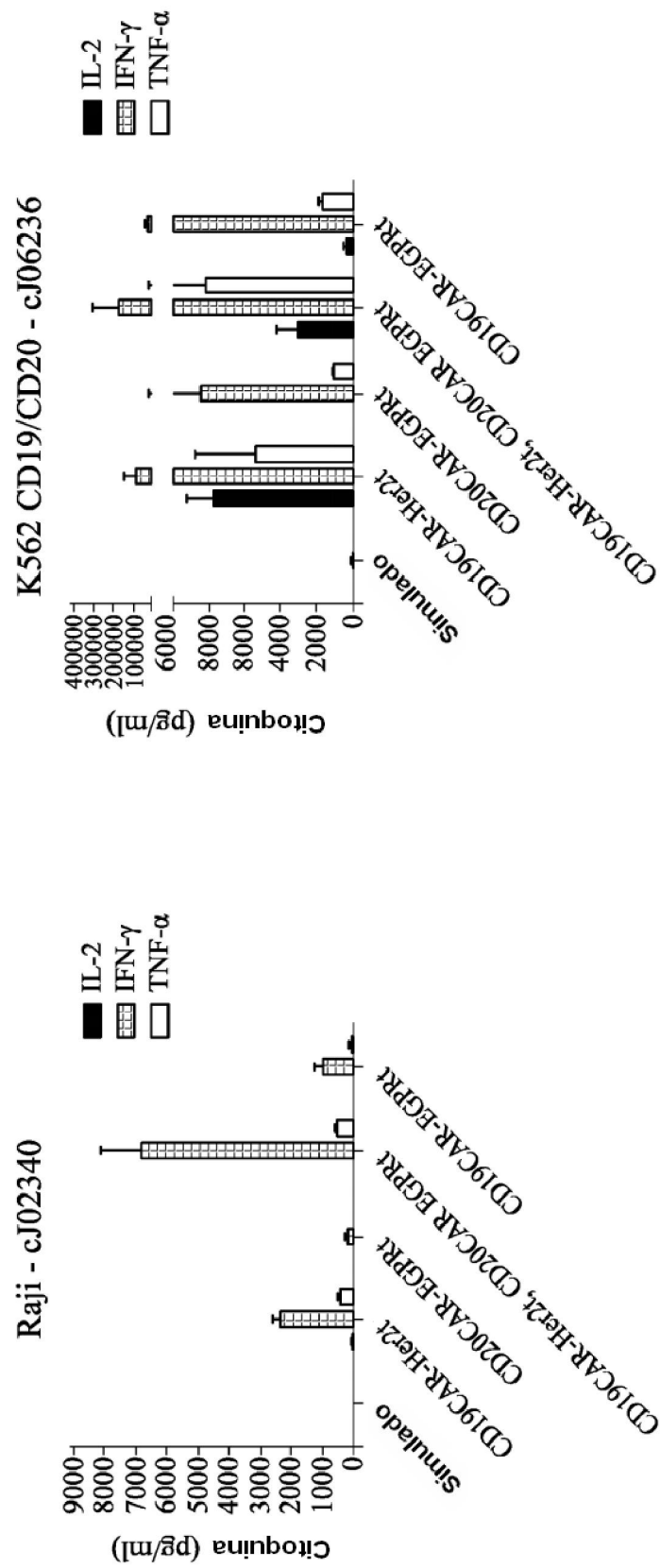


FIG. 4C (CONT.)

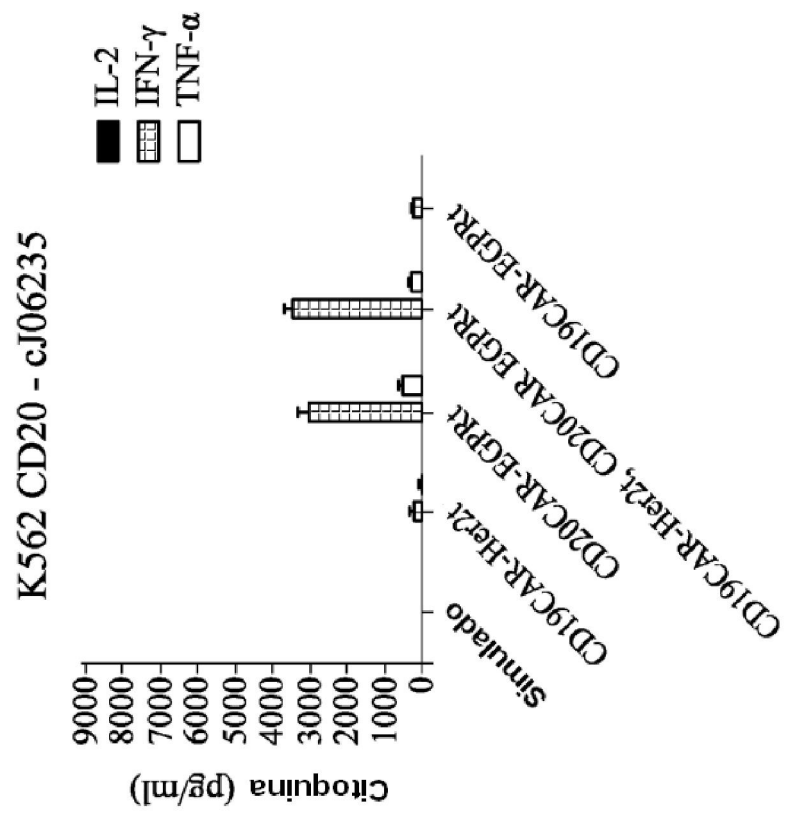


FIG. 4C (CONT.)

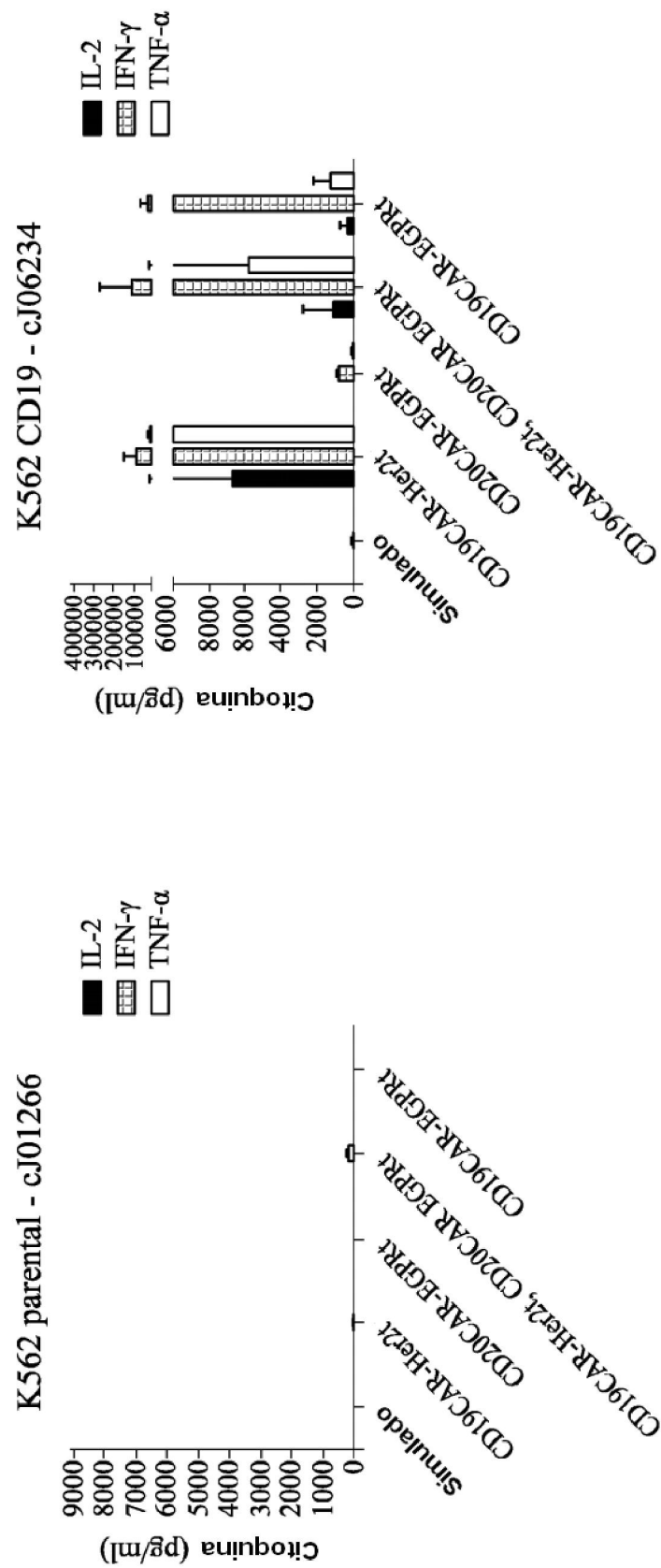


FIG. 4D

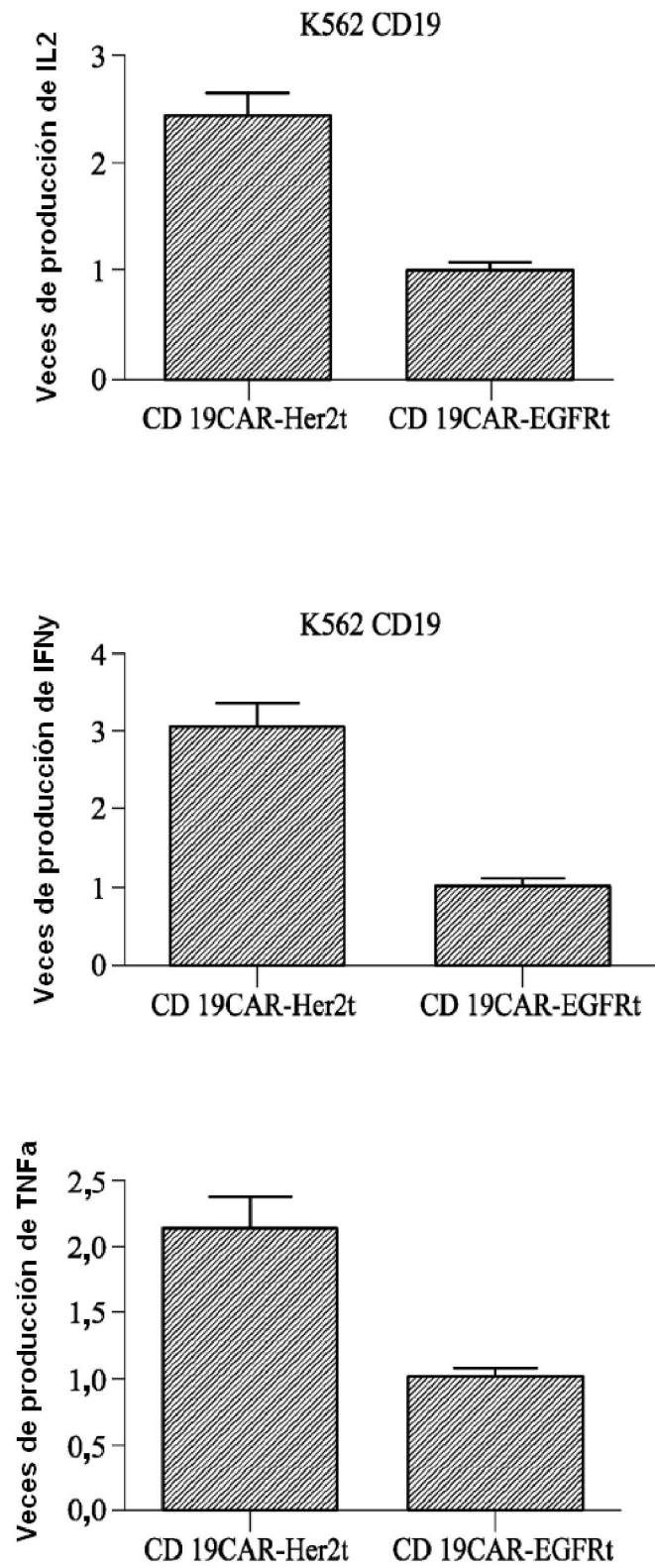


FIG. 5A

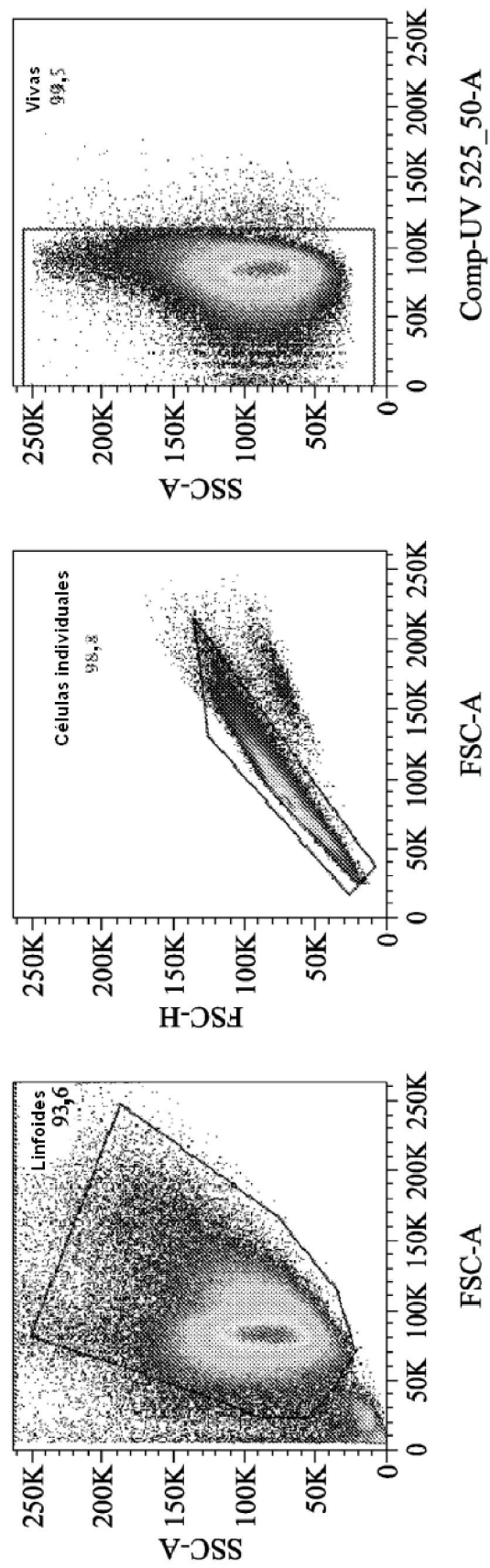


FIG. 5B

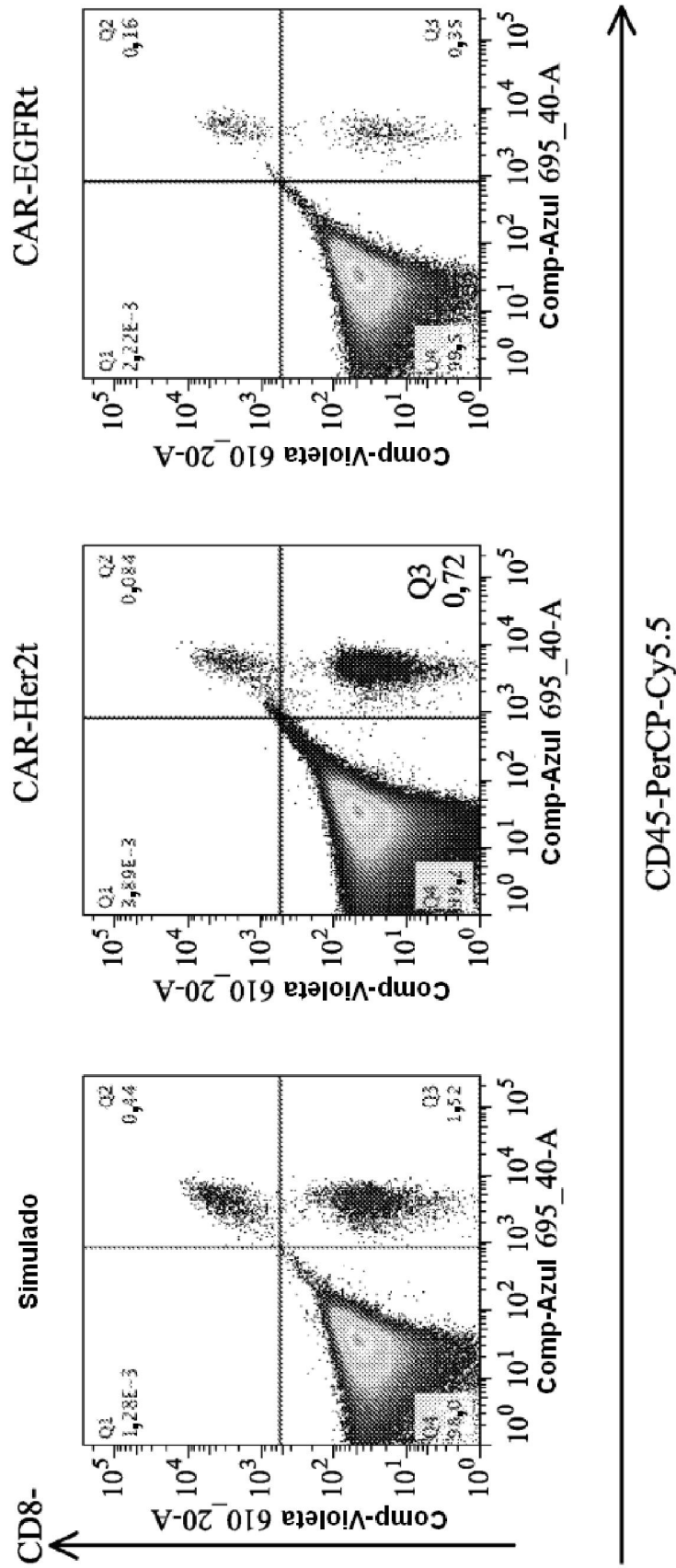


FIG. 5C

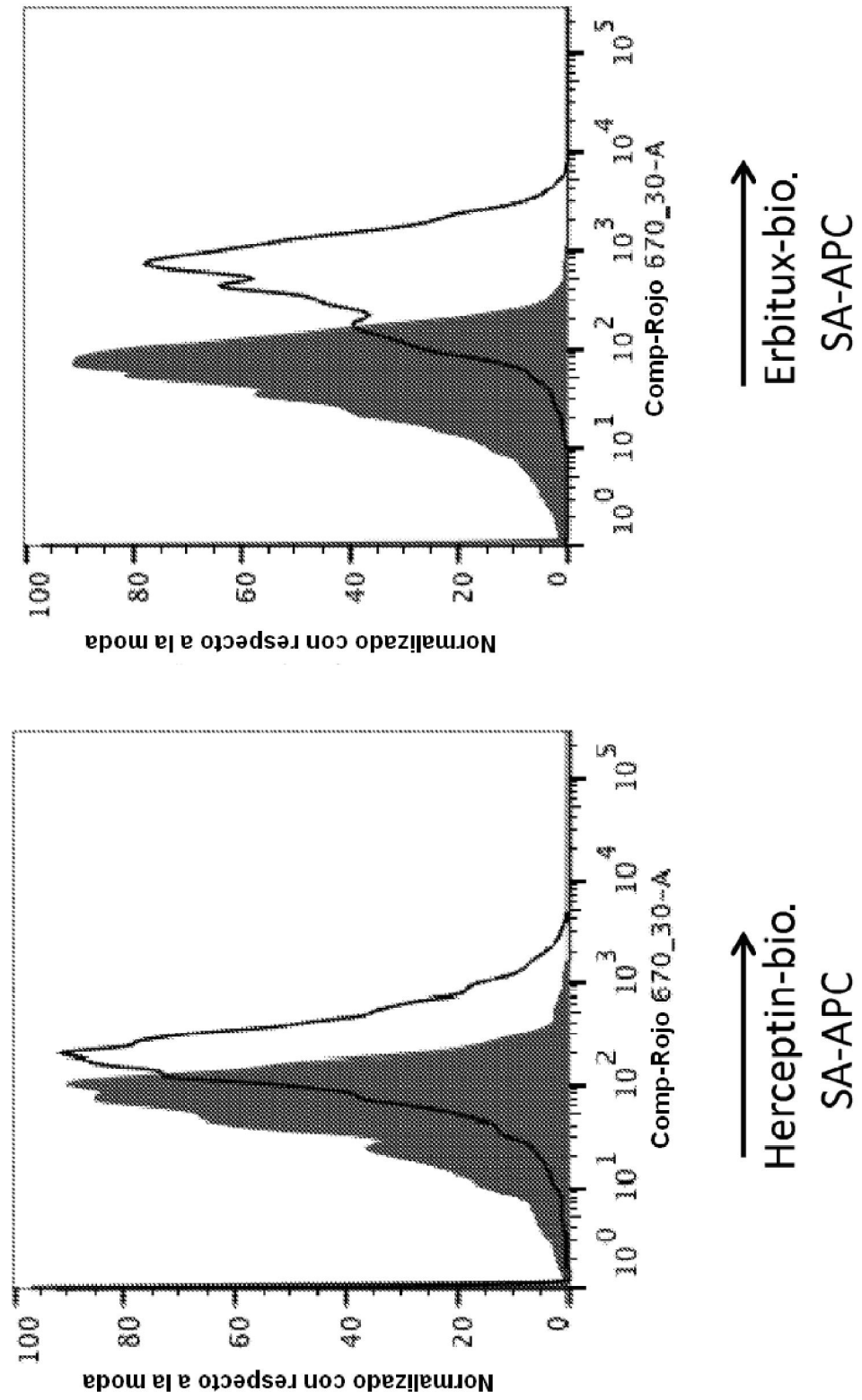
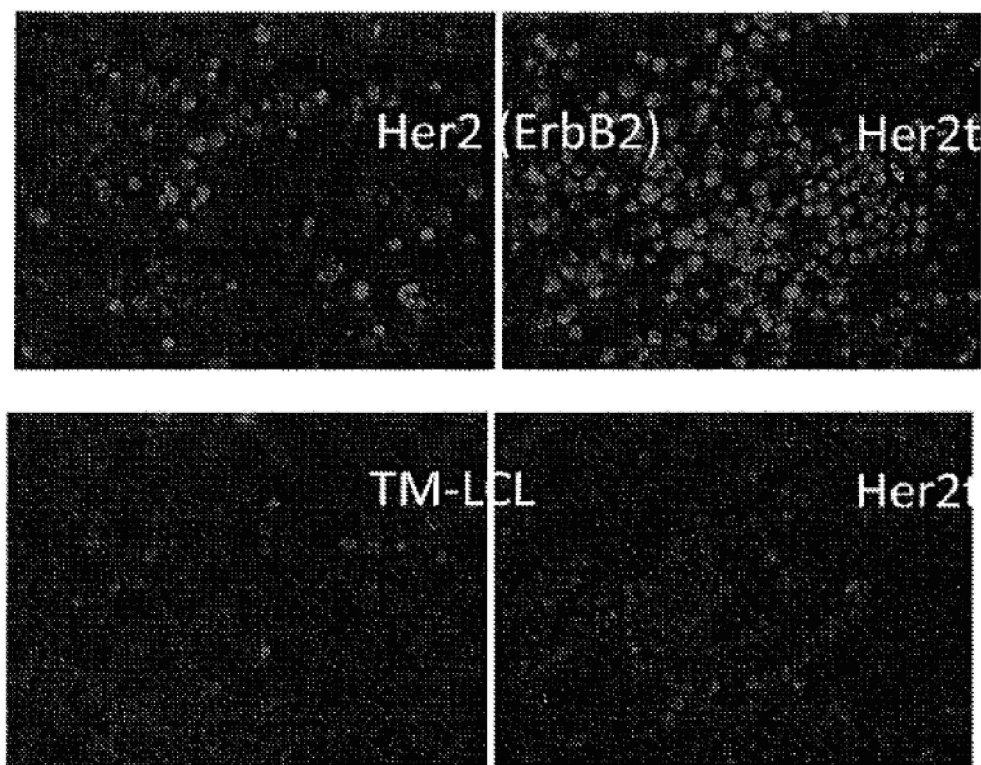


FIG. 5D



Herceptin-bio.SA-AF647
Hoechst

FIG. 6

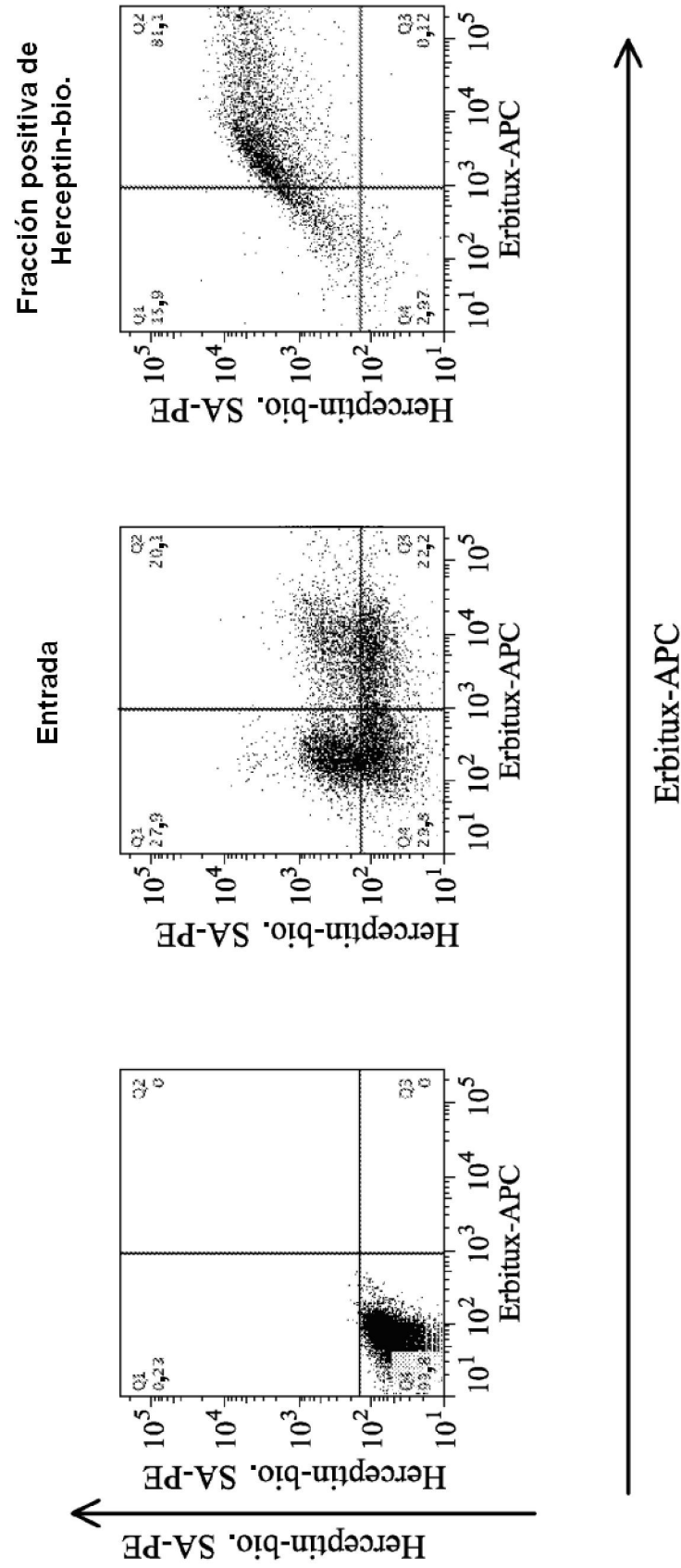


FIG. 6 (CONT.)

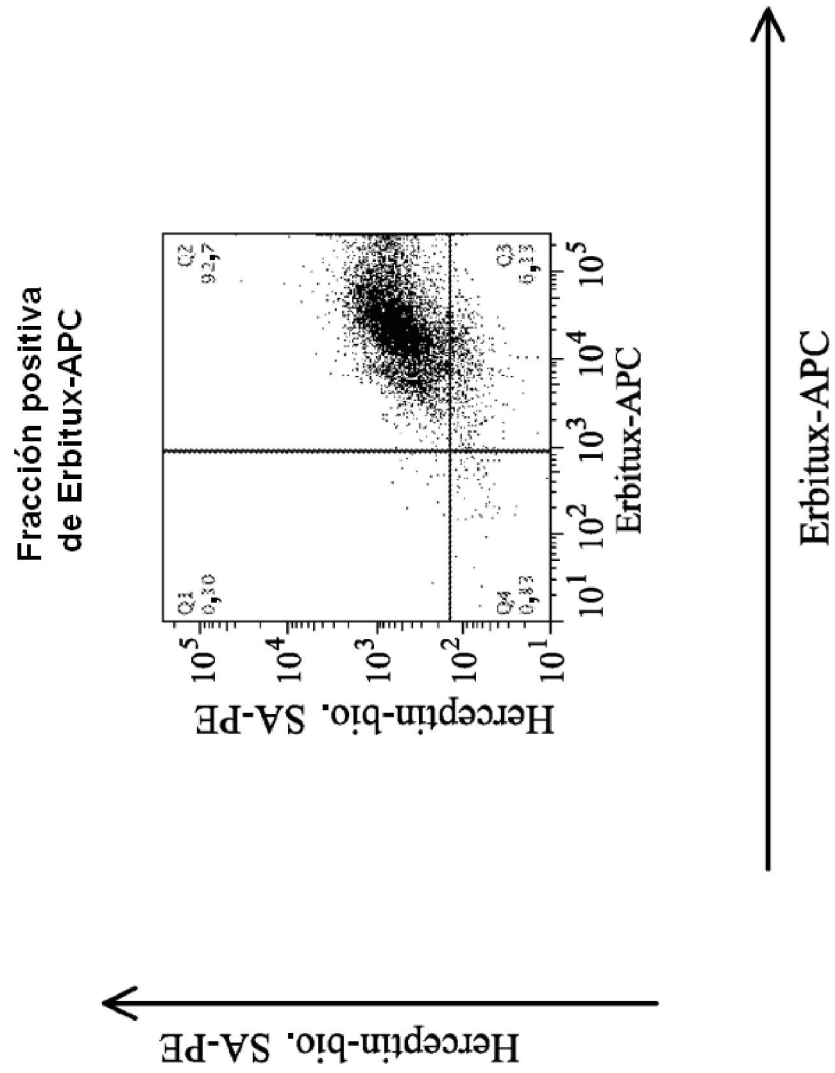


FIG. 7

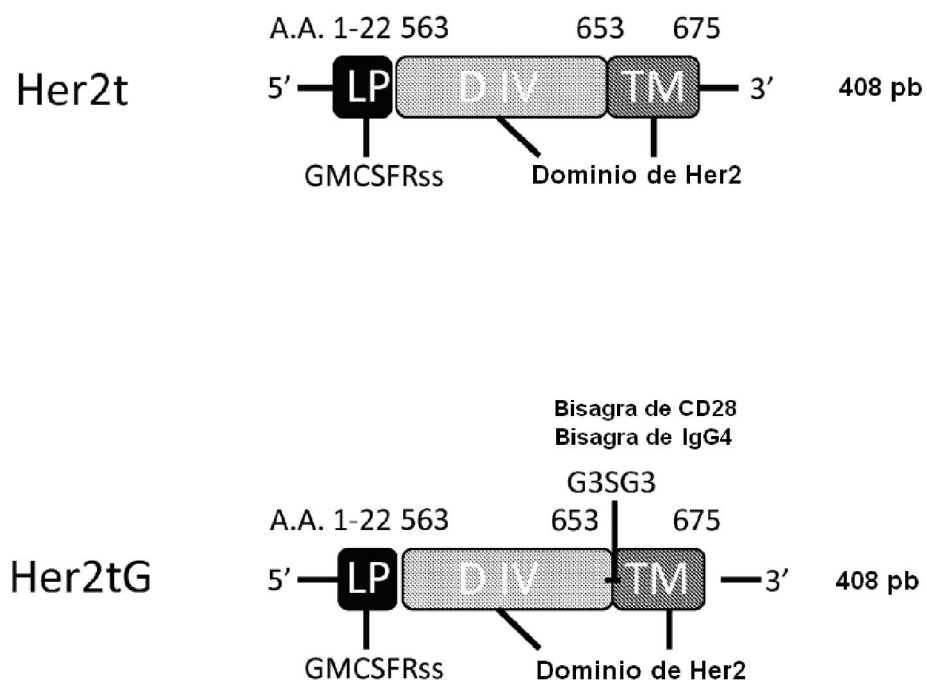


FIG. 8

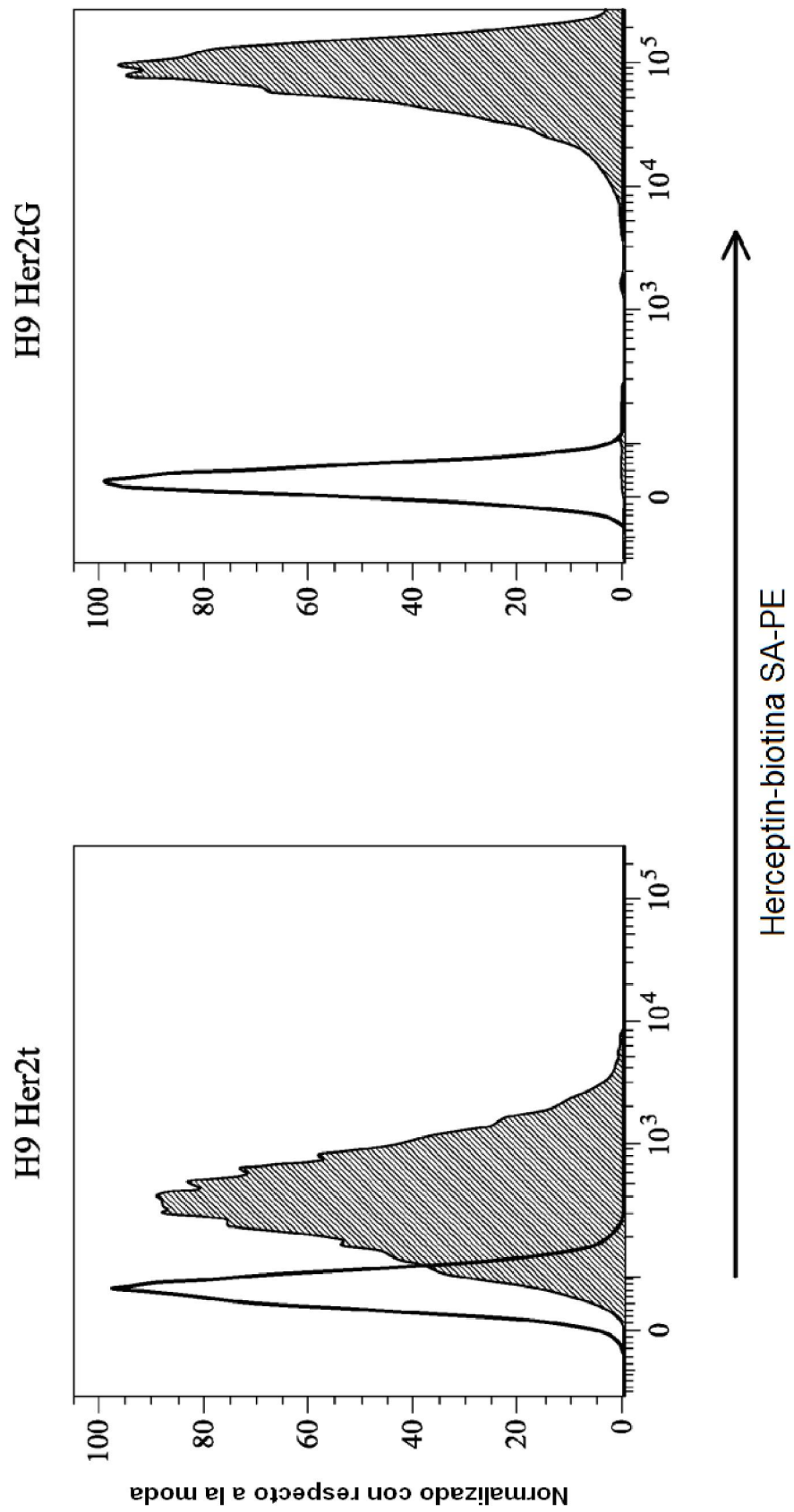


FIG. 9

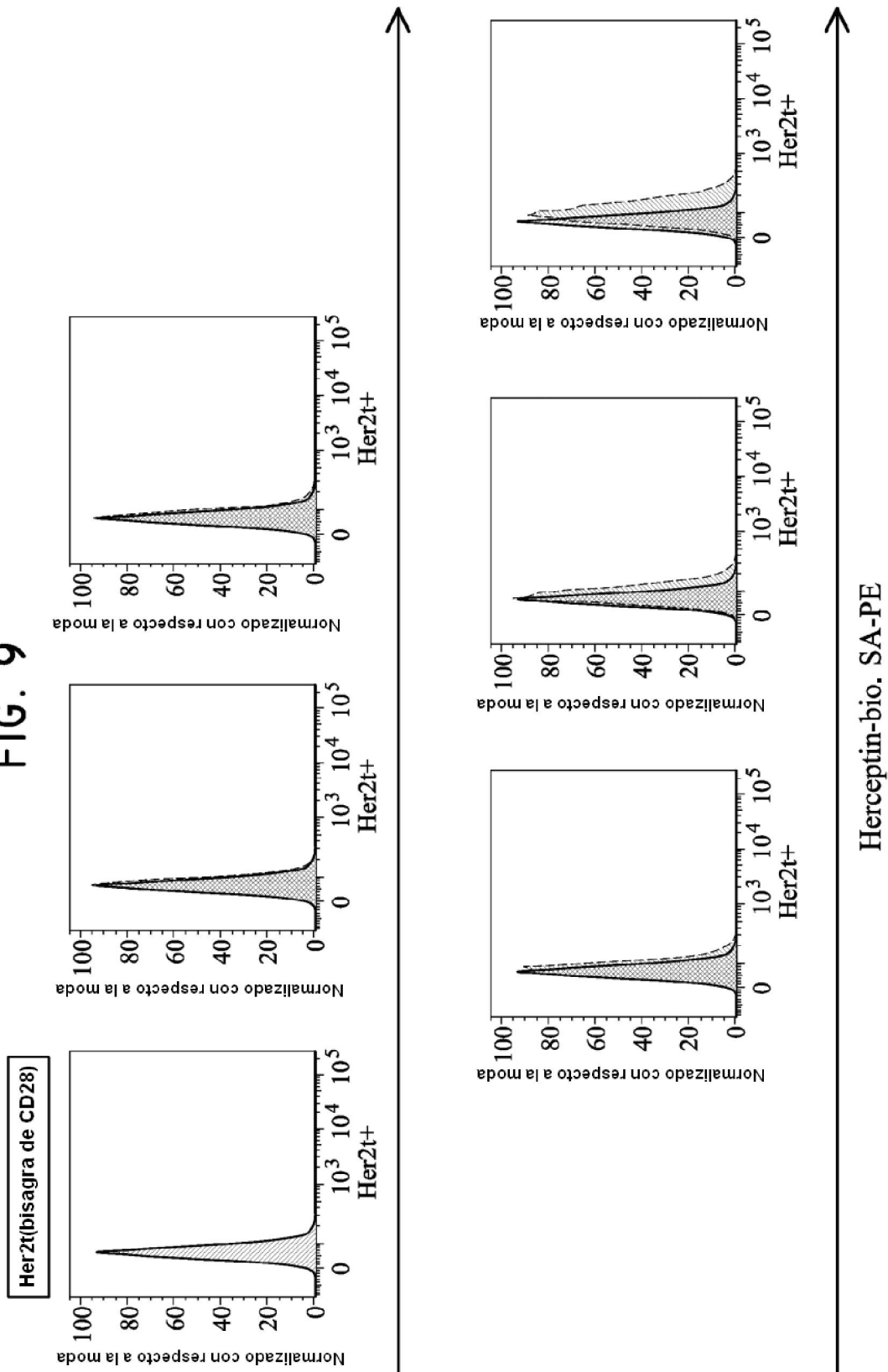


FIG. 9 (CONT.)

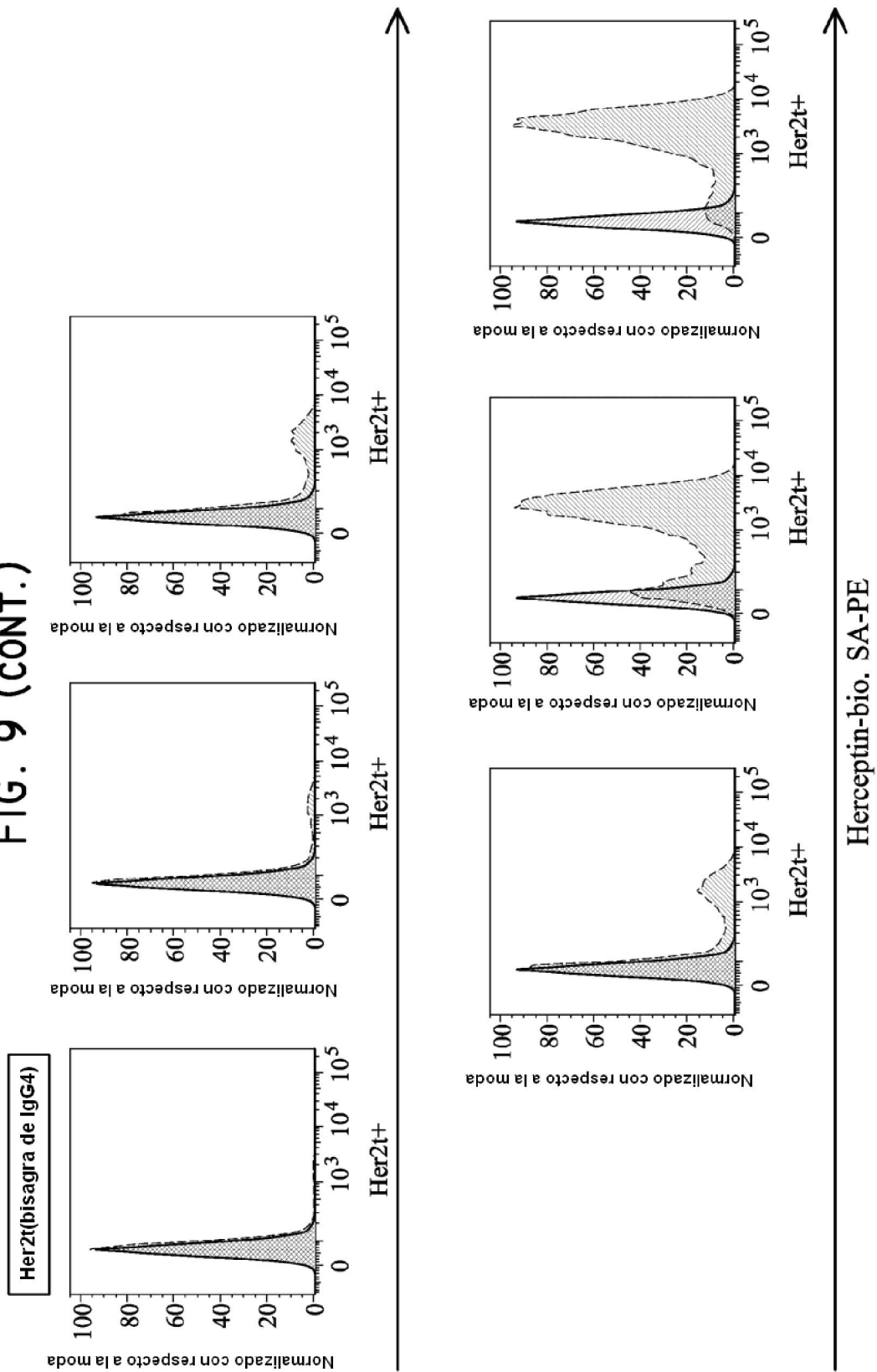


FIG. 9 (CONT.)

