

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 880 932**

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/US2015/024947**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.10.2015 WO15157432**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2015 E 15777065 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.05.2021 EP 3129399**

54 Título: **Expresión transgénica relacionada con fármacos**

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:
26.11.2021

73 Titular/es:

**SEATTLE CHILDREN'S HOSPITAL, DBA
SEATTLE CHILDREN'S RESEARCH INSTITUTE
(100.0%)
1900 9th Avenue
Seattle, WA 98101, US**

72 Inventor/es:

JENSEN, MICHAEL C.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 880 932 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

Expresión transgénica relacionada con fármacos

5 Antecedentes de la invención

La transferencia adoptiva de linfocitos T humanos que se manipulan mediante transferencia génica para expresar receptores de antígenos quiméricos (CAR) específicos para moléculas de superficie expresadas en células tumorales tiene el potencial de tratar eficazmente el cáncer. Los receptores quiméricos son receptores sintéticos que incluyen un dominio de unión al ligando extracelular, más comúnmente un fragmento variable de cadena sencilla de un anticuerpo monoclonal (scFv) unido a componentes de señalización intracelular, más comúnmente CD3ζ solo o combinado con uno o más dominios coestimuladores. Gran parte de la investigación en el diseño de receptores quiméricos se ha centrado en definir scFv y otros elementos de unión al ligando que se dirigen a las células malignas sin causar una toxicidad grave a los tejidos normales esenciales, y en definir la composición óptima de los módulos de señalización intracelular para activar las funciones efectoras de las células T.

Aunque los ensayos clínicos de terapia adoptiva de células T (CAR-T) (células T que expresan al receptor de antígeno quimérico) están demostrando una potente actividad antitumoral, es evidente que pueden surgir toxicidades significativas, por ejemplo, tormenta de citocinas inducida por injertos, síndromes de lisis tumoral y citopenias de células B en curso, cada una de las cuales es atribuible a salidas funcionales no reguladas de CAR expresadas constitutivamente. Dichas toxicidades pueden, en algún contexto, amenazar con limitar la aplicabilidad de la terapia adoptiva de células CAR-T. Los ensayos clínicos que utilizan inmunoterapias de células T adoptivas modificadas con transgén solo han probado células T que expresan constitutivamente el transgén, o que siempre están en el estado "ACTIVO", contribuyendo en gran parte a los efectos secundarios asociados con el transgén. La eliminación de células CAR-T mediada por genes suicidas puede mejorar tales toxicidades; sin embargo, este enfoque corre el riesgo de una atenuación prematura de la actividad antitumoral y tiene un impacto significativo en el potencial curativo.

Las tecnologías actuales de expresión transgénica reguladas por moléculas pequeñas se basan en una variedad de aportaciones de fármacos que incluyen macrólidos, ecdisomas y análogos de rapamicina. La aplicabilidad clínica de estos sistemas es limitada debido a efectos tóxicos fuera del objetivo, perfiles de biodistribución y farmacodinámica desfavorables, intervalo dinámico limitado de salida y/o disponibilidad limitada como productos farmacéuticos disponibles comercialmente aprobados por la FDA. Además, muchos de estos sistemas utilizan reguladores transcripcionales quiméricos contruidos a partir de componentes xenogénicos, lo que introduce la complicación de la inmunogenicidad al aplicar estos sistemas a la terapéutica humana.

Jensen, M. C. y Riddell, S. R.: "Design and implementation of adoptive therapy with chimeric antigen receptor modified T cells", IMMUNOLOGICAL REVIEWS, vol. 257, no. 1, número especial, 13 de diciembre de 2013, divulga la expresión de CAR mediante promotores inducibles y menciona activadores transcripcionales xenogénicos convencionales Tales como los sistemas Tet-O.

El documento WO 2012/099973 A2 divulga la expresión de CAR mediante promotores inducibles y menciona promotores de metalotioneína, glucocorticoide, progesterona y tetraciclina.

Existe la necesidad de identificar métodos para determinar elementos de diseño del receptor quimérico que son importantes para que la actividad terapéutica y las poblaciones celulares se modifiquen genéticamente y se transfieran adoptivamente, lo que proporcionará una supervivencia y eficacia mejoradas *in vivo* al tiempo que se minimizan los efectos secundarios adversos. También existe la necesidad de sistemas de expresión y métodos para modular células para su uso en terapia celular, tales como para modular la expresión de receptores de antígenos recombinantes como CAR y/u otras moléculas expresadas por dichas células, tales como para mejorar la actividad terapéutica, mejorar la supervivencia y/o eficacia *in vivo* y/o minimizar los efectos secundarios adversos.

Sumario de la invención

Un aspecto de la divulgación incluye un sistema genético para administrar la expresión transgénica regulada por fármacos en las células. En una alternativa, la expresión del transgén regulada se dirige a las células, tales como los linfocitos diseñados para su uso en inmunoterapia adoptiva. Este sistema proporciona atributos de seguridad rigurosos para las estrategias terapéuticas adoptivas redirigidas al receptor de antígeno quimérico (CAR) sin sacrificar la intención curativa que permite el control clínico en tiempo real de la expresión de CAR *in vivo*. Mediante vectores modificados que permiten el control transcripcional sensible al fármaco de la expresión de CAR, la actividad de los CAR y otros mediadores celulares puede "ACTIVARSE" y "DESACTIVARSE" *in vivo*, con base en la entrada de un fármaco farmacéutico prescrito por un médico que exhibe una farmacocinética clínicamente permisiva, distribución tisular, y la partición entre el espacio extracelular y el citosol de los linfocitos. El sistema genético proporciona la expresión transgénica regulada por el fármaco para hacer cumplir un estado funcional "DESACTIVADO" en ausencia del fármaco y una expresión transgénica de estado funcional "ACTIVO" en presencia del fármaco.

Una alternativa de dicho fármaco es el tamoxifeno. El tamoxifeno es un antagonista/agonista parcial de estrógenos que es un fármaco aprobado por la FDA y disponible comercialmente. Se toma por vía oral y se puede administrar a diario durante un período de tiempo prolongado. El tamoxifeno tiene un historial de seguridad probado, un perfil farmacocinético favorable, una distribución tisular excelente y un coeficiente de partición bajo entre el espacio extracelular y el citosol. Se pueden seleccionar otros fármacos en función del historial de seguridad, el perfil farmacocinético favorable y la excelente distribución tisular, un bajo coeficiente de partición entre el espacio extracelular y el citosol y/o bajas toxicidades.

En algunas alternativas, el sistema emplea un regulador transcripcional sintético que, en presencia de tamoxifeno, se une a un promotor sintético secuencia arriba de un transgén para inducir la expresión. El factor de transcripción regulado por tamoxifeno ("TamR-tf", también denominado "HEA3") es un factor de transcripción quimérico compuesto por subunidades humanas, incluido el dominio de unión al ADN del extremo terminal N del factor nuclear de hepatocitos 1-alfa (HNF-1 α) fusionado en el marco al dominio mutante de unión al ligando específico de tamoxifeno del dominio de unión al ligando del receptor de estrógeno (ER-LBD), que a su vez se fusiona con el dominio de activación de p65 de NF- κ B (p65). En la Tabla 10 se proporciona un ejemplo de secuencia de aminoácidos y se identifica como la SEQ ID NO: 40. El dominio mutante de unión al ligando específico de tamoxifeno del dominio de unión al ligando del receptor de estrógeno (ER-LBD) se encuentra en los aminoácidos 282-595 del TamR-tf y tiene una mutación en la posición 521. El dominio de activación de p65 de NF- κ B (p65) se encuentra en los aminoácidos 596-862 de la SEQ ID NO: 40. Se pueden realizar cambios adicionales en el activador transcripcional para aumentar las propiedades del factor de transcripción incluyendo, sin limitación, alterar uno o más aminoácidos en el dominio de unión al ligando del receptor de estrógeno para aumentar la afinidad del factor por los análogos de estrógenos y alterar uno o más aminoácidos en el dominio transactivador de p65.

En ausencia de tamoxifeno, TamR-tf se excluye del núcleo mediante la unión de la proteína de choque térmico citosólico 90 (HSP90) al sitio activo de unión del tamoxifeno y la expresión del transgén está en el estado "DESACTIVADO". Las concentraciones nanomolares de tamoxifeno citosólico compiten activamente con HSP90 por la unión de ER-LBD, lo que resulta en la translocación de TamR-tf al núcleo. Tras la translocación nuclear, TamR-tf está fácilmente disponible para unirse a su promotor sintético restringido (por ejemplo, 7xHBD/EF1 α p). En presencia de tamoxifeno, la unión de TamR-tf al promotor 7xHBD/EF1 α p induce el estado "ACTIVADO" de la expresión del transgén. En algunas alternativas, este regulador transcripcional puede modificarse para proporcionar un nivel variable de control de la expresión transgénica. Las sustituciones de aminoácidos en el LBD de TamR-tf permiten una respuesta selectiva al tamoxifeno y sus metabolitos, en el que el 4-hidroxi tamoxifeno (4-OHT) es el metabolito más activo farmacológicamente, en lo que respecta a la actividad de TamR-tf, mientras que carece de interacción con el estrógeno endógeno.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a métodos y composiciones para conferir y/o aumentar las respuestas inmunitarias mediadas por inmunoterapia celular, tal como, mediante la transferencia adoptiva de subconjuntos modificados genéticamente específicos del tumor, de células T CD8+ o CD4+ solas o en combinación. La divulgación proporciona ácidos nucleicos de receptores quiméricos y vectores y células huésped que incluyen dichos ácidos nucleicos. La secuencia de ácidos nucleicos que codifica el receptor quimérico une una serie de componentes modulares que se pueden escindir y reemplazar con otros componentes para personalizar el receptor quimérico para la activación eficaz de las células T y el reconocimiento de una molécula diana específica o un epítipo en la molécula diana y proporcionar la transcripción regulada como se describe en el presente documento.

La presente invención se refiere a un sistema para la expresión inducible de un polinucleótido que comprende: a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por tamoxifeno, un metabolito del tamoxifeno o un análogo del tamoxifeno, en el que el primer promotor comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 41, y en el que el primer promotor está operativamente unido a un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), en el que el CAR comprende: un dominio de unión al ligando específico para un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, una molécula viral o una molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito cuando interactúa con el dominio de unión al ligando, un espaciador polipeptídico, un dominio transmembrana, un dominio de señalización intracelular; b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor constitutivo, tal como un promotor de EF1 α , en el que el segundo promotor está operativamente unido a un ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el primer promotor y comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40; c) tamoxifeno, un metabolito del tamoxifeno o un análogo del tamoxifeno; y d) un estimulador de activación que comprende un anti-CD3 y/o un anti-CD28. En algunas alternativas, un sistema para la expresión inducible de un receptor de antígeno quimérico comprende: un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el dominio de unión al ligando es específico para un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular; y un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido al ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor

inducible. En algunas alternativas, el fármaco es el tamoxifeno y/o sus metabolitos. En algunas alternativas, el espaciador está optimizado para una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia. En algunas alternativas, el segundo promotor es constitutivo o inducible.

En algunas alternativas, un sistema para la expresión inducible de un receptor de antígeno quimérico comprende: un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica una citocina, una quimiocina, un polipéptido que regula la apoptosis y/o un polipéptido que modula la señalización del punto de control; y un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido a un ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el segundo promotor es constitutivo o inducible. En un ejemplo alternativo, el segundo ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico, bajo el control de un promotor constitutivo. En algunas alternativas, el fármaco es el tamoxifeno y/o sus metabolitos.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona composiciones para conferir y/o aumentar las respuestas inmunitarias mediadas por inmunoterapia celular, tal como mediante la transferencia adoptiva de células T CD4+ modificadas genéticamente específicas de un subconjunto específico de tumor, en las que las células T CD4+ confieren y/o aumentan la capacidad de las células T CD8+ para mantener la reactividad antitumoral y aumentar y/o maximizar la proliferación específica del tumor. En algunas alternativas, las células CD4+ se modifican genéticamente para expresar un ácido nucleico receptor quimérico y/o polipéptido receptor quimérico bajo el control de un promotor regulado, como se describe en el presente documento.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona composiciones para conferir y/o aumentar las respuestas inmunitarias mediadas por inmunoterapia celular, tal como mediante la transferencia adoptiva de células T modificadas genéticamente específicas del subconjunto específicas del tumor. En algunas alternativas, las células son células T precursoras. En algunas alternativas, las células son células madre hematopoyéticas. En algunas alternativas, las células son células T CD8+. En algunas alternativas, las células T CD8+ expresan un ácido nucleico receptor quimérico y/o polipéptido receptor quimérico bajo el control de un promotor regulado, como se describe en el presente documento.

Algunas alternativas se refieren a métodos para realizar inmunoterapia celular en un sujeto que padece una enfermedad o trastorno mediante la administración al sujeto de una preparación de células de linfocitos T modificados genéticamente que proporciona una respuesta inmune celular y la administración de un fármaco que induce un transgén en las células de linfocitos T modificadas genéticamente. En algunas alternativas, la preparación de células de linfocitos T modificadas genéticamente comprende células T precursoras. En algunas alternativas, la preparación de células de linfocitos T modificadas genéticamente comprende células madre hematopoyéticas. En algunas alternativas, la población de células CD8+ modificadas genéticamente y CD4+ modificadas genéticamente se administran conjuntamente. En algunas alternativas, el fármaco es el tamoxifeno y/o sus metabolitos. En algunas alternativas, las células T son células T autólogas o alogénicas. Son posibles varias modificaciones del método anterior. Por ejemplo, el receptor quimérico que expresa la célula T CD4+ y la célula T CD8+ puede ser el mismo o diferente.

En algunas alternativas, se proporciona un sistema para la expresión inducible de un receptor de antígeno quimérico, en el que el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el dominio de unión al ligando es específico para un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular; y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido al ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el fármaco es el tamoxifeno y/o sus metabolitos. En algunas alternativas, el segundo promotor es inducible. En algunas alternativas, el segundo promotor es constitutivo. En algunas alternativas, el primer promotor comprende una secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 41. En algunas alternativas, el segundo promotor es un promotor constitutivo. En algunas alternativas, el segundo promotor es el EFlap. En algunas alternativas, el activador transcripcional comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 40. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además un primer vector y el segundo ácido nucleico comprende además un segundo vector. En algunas alternativas, ambos vectores se empaquetan en un vector viral. En algunas alternativas, el vector viral es un lentivirus. En algunas alternativas, el primer y segundo ácido nucleico comprenden un vector. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un marcador seleccionable. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable. En algunas alternativas, el espaciador está optimizado para una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia.

En algunas alternativas, se proporciona un sistema para la expresión inducible de un receptor de antígeno quimérico, en el que el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el dominio de unión al ligando es específico para un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador es un polinucleótido optimizado que codifica un dominio transmembrana; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido al ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el segundo promotor es constitutivo o inducible. En algunas alternativas, el fármaco es el tamoxifeno y/o sus metabolitos. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el dominio de unión al ligando es específico para un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el fármaco es el tamoxifeno y/o sus metabolitos. En algunas alternativas, el primer promotor está en orientación opuesta al segundo promotor. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento de anticuerpo. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento variable de cadena sencilla. En algunas alternativas, la molécula específica del tumor es CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, CE7, EGFR, hB7H3, mesotelina, c-Met, PSMA, Her2, GD-2 o MAGE A3 TCR o combinaciones de las mismas. En algunas alternativas, el espaciador está optimizado para una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia. En algunas alternativas, el segundo promotor es inducible. En algunas alternativas, el segundo promotor es constitutivo.

En algunas alternativas, se proporciona un polipéptido receptor quimérico, en el que el polipéptido receptor quimérico está codificado por un sistema. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el dominio de unión al ligando es específico para un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular; y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido al ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el segundo promotor es constitutivo o inducible. En algunas alternativas, el fármaco es el tamoxifeno y/o sus metabolitos. En algunas alternativas, el primer promotor comprende una secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 41. En algunas alternativas, el segundo promotor es un promotor constitutivo. En algunas alternativas, el segundo promotor es el EFlap. En algunas alternativas, el activador transcripcional comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 40. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además un primer vector y el segundo ácido nucleico comprende además un segundo vector. En algunas alternativas, ambos vectores se empaquetan en un vector viral. En algunas alternativas, el vector viral es un lentivirus. En algunas alternativas, el primer y segundo ácido nucleico comprenden un vector. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un marcador seleccionable. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable. En algunas alternativas, el segundo promotor es un promotor inducible. En algunas alternativas, el espaciador está optimizado para una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia.

En algunas alternativas, se proporciona un sistema para la expresión inducible del receptor de antígeno quimérico, en el que el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica una citocina, un receptor de quimiocina, un polipéptido que regula la apoptosis o un polipéptido que modula la señalización del punto de control y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido al ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el segundo promotor es constitutivo o inducible. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el dominio de unión al ligando es específico para un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el primer promotor está en orientación opuesta al segundo promotor. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento de anticuerpo, preferiblemente un dominio de unión del mismo. En algunas alternativas, la molécula específica del tumor es CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1,

CE7, EGFR, hB7H3, mesotelina, c-Met, PSMA, Her2, GD-2 o MAGE A3 TCR o combinaciones de las mismas. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica una citocina, un receptor de quimiocinas, un polipéptido que regula la apoptosis o un polipéptido que modula la señalización del punto de control; y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido al ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el segundo promotor es constitutivo o inducible. En algunas alternativas, el fármaco es el tamoxifeno y/o sus metabolitos. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica el receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el primer promotor está en orientación opuesta al segundo promotor. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento de anticuerpo, preferiblemente un fragmento de unión del mismo. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento variable de cadena sencilla. En algunas alternativas, la molécula específica del tumor es CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, CE7, EGFR, hB7H3, mesotelina, c-Met, PSMA, Her2, GD-2 o MAGE A3 TCR o combinaciones de las mismas. En algunas alternativas, el espaciador está optimizado para una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia.

La presente invención se refiere a una célula huésped, en la que la célula huésped comprende un sistema, para su uso en el tratamiento de un cáncer o una infección viral. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular; y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido al ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el segundo promotor es constitutivo o inducible. En algunas alternativas, el fármaco es el tamoxifeno y/o sus metabolitos. En algunas alternativas, el primer promotor comprende una secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 41. En algunas alternativas, el segundo promotor es un promotor constitutivo. En algunas alternativas, el segundo promotor es el EFlap. En algunas alternativas, el activador transcripcional comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 40. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además un primer vector y el segundo ácido nucleico comprende además un segundo vector. En algunas alternativas, ambos vectores se empaquetan en un vector viral. En algunas alternativas, el vector viral es un lentivirus. En algunas alternativas, el primer y segundo ácido nucleico comprenden un vector. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un marcador seleccionable. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el dominio de unión al ligando es específico para un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el primer promotor está en orientación opuesta al segundo promotor. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento de anticuerpo, preferiblemente un fragmento de unión del mismo. En algunas alternativas, la molécula específica del tumor es CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, CE7, EGFR, hB7H3, mesotelina, c-Met, PSMA, Her2, GD-2 o MAGE A3 TCR o combinaciones de las mismas. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica una citocina, un receptor de quimiocinas, un polipéptido que regula la apoptosis o un polipéptido que modula la señalización del punto de control; y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido al ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el segundo promotor es constitutivo o inducible. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica el receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el primer promotor está en orientación opuesta al segundo promotor. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento de anticuerpo, preferiblemente un fragmento de unión del mismo. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento variable de cadena sencilla. En algunas alternativas, la molécula específica del tumor es CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, CE7, EGFR, hB7H3, mesotelina, c-Met, PSMA, Her2, GD-2 o MAGE A3 TCR o

combinaciones de las mismas. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula linfocítica T citotóxica CD8+ seleccionada del grupo que consiste en células T CD8+ no modificadas, células T CD8+ de memoria central, células T CD8+ de memoria efectora y células T CD8+ a granel. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula linfocítica T colaboradora CD4+ que se selecciona del grupo que consiste en linfocitos T CD4+ no modificadas, células T CD4+ de memoria central, células T CD4+ de memoria efectora y células T CD4+ a granel. En algunas alternativas, el espaciador está optimizado para una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia. En algunas alternativas, la célula huésped es la célula T precursora. En algunas alternativas, la célula T precursora es una célula madre hematopoyética.

En algunas alternativas, se proporciona una composición, en la que la composición comprende una célula huésped en un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas alternativas, la célula huésped comprende un sistema. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular; y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido al ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el segundo promotor es constitutivo o inducible. En algunas alternativas, el fármaco es el tamoxifeno y/o sus metabolitos. En algunas alternativas, el primer promotor comprende una secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 41. En algunas alternativas, el segundo promotor es un promotor constitutivo. En algunas alternativas, el segundo promotor es el EFlap. En algunas alternativas, el activador transcripcional comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 40. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además un primer vector y el segundo ácido nucleico comprende además un segundo vector. En algunas alternativas, ambos vectores se empaquetan en un vector viral. En algunas alternativas, el vector viral es un lentivirus. En algunas alternativas, el primer y segundo ácido nucleico comprenden un vector. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un marcador seleccionable. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el primer promotor está en orientación opuesta al segundo promotor. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento de anticuerpo. En algunas alternativas, la molécula específica del tumor es CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, CE7, EGFR, hB7H3, mesotelina, c-Met, PSMA, Her2, GD-2 o MAGE A3 TCR o combinaciones de las mismas. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica una citocina, un receptor de quimiocinas, un polipéptido que regula la apoptosis o un polipéptido que modula la señalización del punto de control; y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido al ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el segundo promotor es constitutivo o inducible. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica el receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el dominio de unión al ligando es específico para un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el primer promotor está en orientación opuesta al segundo promotor. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento de anticuerpo, preferiblemente un fragmento de unión del mismo. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento variable de cadena sencilla. En algunas alternativas, la molécula específica del tumor es CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, CE7, EGFR, hB7H3, mesotelina, c-Met, PSMA, Her2, GD-2 o MAGE A3 TCR o combinaciones de las mismas. En algunas alternativas, la célula huésped es la célula T precursora. En algunas alternativas, la célula T precursora es una célula madre hematopoyética. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula linfocítica T citotóxica CD8+ seleccionada del grupo que consiste en células T CD8+ no modificadas, células T CD8+ de memoria central, células T CD8+ de memoria efectora y células T CD8+ a granel. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula linfocítica T colaboradora CD4+ que se selecciona del grupo que consiste en células T CD4+ no modificadas, células T CD4+ de memoria central, células T CD4+ de memoria efectora y células T CD4+ a granel. En algunas alternativas, la composición comprende una célula huésped en la que la célula huésped es una célula citotóxica T CD8+ seleccionada del grupo que consiste en células T CD8+ no modificadas, células T CD8+ de memoria central, células T CD8+ de memoria efectora y células T CD8+ a granel y además comprende otra célula huésped en la que la célula huésped es una célula linfocítica T colaboradora CD4+ que se selecciona del grupo que consiste en células T CD4+ no modificadas, células T CD4+ de memoria central, células T CD4+ de memoria efectora y células T CD4+ a granel. En algunas alternativas, la célula huésped es la célula

T precursora. En algunas alternativas, la célula T precursora es una célula madre hematopoyética. En algunas alternativas, el espaciador está optimizado para una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia. En algunas alternativas, la composición comprende una célula huésped en la que la célula huésped es una célula citotóxica T CD8+ seleccionado del grupo que consiste en células T CD8+ no modificadas, células T CD8+ de memoria central, células T CD8+ de memoria efectora y células T CD8+ a granel o la célula huésped es una célula linfocítica T colaboradora CD4+ que se selecciona del grupo que consiste en células T CD4+ sin modificar, células T CD4+ de memoria central, células T CD4+ de memoria efectora y células T CD4+ a granel y una segunda célula huésped, en la que la segunda célula huésped es una célula T precursora o una célula madre hematopoyética.

La presente invención se refiere a un método *in vitro* para preparar una célula huésped que comprende un sistema, que comprende: a) proporcionar el sistema; b) introducir el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico en una población de linfocitos T aislada separada; c) expandir la población de linfocitos T *in vitro*; y d) cultivar la población de linfocitos T en presencia de (i) el tamoxifeno, el metabolito del tamoxifeno o el análogo del tamoxifeno, (ii), el estimulador de activación que comprende un anti CD3 y/o un anti-CD28, y (iii) al menos una citocina homeostática, de manera que la población de linfocitos T se expanda lo suficiente para su uso como infusión de células.

En algunas alternativas, se proporciona un método *in vitro* para preparar una célula huésped en el que el método comprende a) proporcionar un sistema y b) introducir el sistema en una población de linfocitos T aislada separada y expandir cada población de linfocitos T *in vitro*. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el dominio de unión al ligando es específico para un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular; y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido al ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el segundo promotor es constitutivo o inducible. En algunas alternativas, el fármaco es el tamoxifeno y/o sus metabolitos. En algunas alternativas, el segundo promotor es constitutivo o inducible. En algunas alternativas, el primer promotor comprende una secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 41. En algunas alternativas, el segundo promotor es un promotor constitutivo. En algunas alternativas, el segundo promotor es el EFlap. En algunas alternativas, el activador transcripcional comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 40. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además un primer vector y el segundo ácido nucleico comprende además un segundo vector. En algunas alternativas, ambos vectores se empaquetan en un vector viral. En algunas alternativas, el vector viral es un lentivirus. En algunas alternativas, el primer y segundo ácido nucleico comprenden un vector. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un marcador seleccionable. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, donde el dominio de unión al ligando es específico para un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el primer promotor está en orientación opuesta al segundo promotor. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento de anticuerpo, preferiblemente un fragmento de unión al mismo. En algunas alternativas, la molécula específica del tumor es CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, CE7, EGFR, hB7H3, mesotelina, c-Met, PSMA, Her2, GD-2 o MAGE A3 TCR o combinaciones de las mismas. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica una citocina, un receptor de quimiocinas, un polipéptido que regula la apoptosis o un polipéptido que modula la señalización del punto de control; y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido al ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el segundo promotor es constitutivo o inducible. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica el receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el primer promotor está en orientación opuesta al segundo promotor. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento de anticuerpo, preferiblemente un fragmento de unión al mismo. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento variable de cadena sencilla. En algunas alternativas, la molécula específica del tumor es CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, CE7, EGFR, hB7H3, mesotelina, c-Met, PSMA, Her2, GD-2 o MAGE A3 TCR o combinaciones de las mismas. En algunas alternativas, en las que los linfocitos T se expanden, el método comprende

además cultivar las células en presencia de anti CD3 y/o anti-CD28, y al menos una citocina homeostática hasta que las células se expandan lo suficiente para su uso como infusión celular. En algunas alternativas, el linfocito es CD8+ o CD4+. En algunas alternativas, el espaciador está optimizado para una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia. En algunas alternativas, la célula huésped es la célula T precursora. En algunas alternativas, la célula T precursora es una célula madre hematopoyética.

En algunas alternativas, se proporciona el uso de una célula huésped o una composición en combinación con un fármaco que induce la expresión de un transgén en la célula huésped o composición para el tratamiento del cáncer o una infección viral. En algunas alternativas, la célula huésped comprende un sistema. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el dominio de unión al ligando es específico para un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular; y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido al ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el segundo promotor es constitutivo o inducible. En algunas alternativas, el fármaco es tamoxifeno y/o sus metabolitos. En algunas alternativas, el primer promotor comprende una secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 41. En algunas alternativas, el segundo promotor es un promotor constitutivo. En algunas alternativas, el segundo promotor es el EFlap. En algunas alternativas, el activador transcripcional comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 40. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además un primer vector y el segundo ácido nucleico comprende además un segundo vector. En algunas alternativas, ambos vectores se empaquetan en un vector viral. En algunas alternativas, el vector viral es un lentivirus. En algunas alternativas, el primer y segundo ácido nucleico comprenden un vector. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un marcador seleccionable. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el dominio de unión al ligando es específico para un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el primer promotor está en orientación opuesta al segundo promotor. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento de anticuerpo. En algunas alternativas, la molécula específica del tumor es CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, CE7, EGFR, hB7H3, mesotelina, c-Met, PSMA, Her2, GD-2 o MAGE A3 TCR o combinaciones de las mismas. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica una citocina, un receptor de quimiocinas, un polipéptido que regula la apoptosis o un polipéptido que modula la señalización del punto de control; y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido al ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el segundo promotor es constitutivo o inducible. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica el receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el primer promotor está en orientación opuesta al segundo promotor. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento de anticuerpo, preferiblemente un fragmento de unión del mismo. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento variable de cadena sencilla. En algunas alternativas, la molécula específica del tumor es CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, CE7, EGFR, hB7H3, mesotelina, c-Met, PSMA, Her2, GD-2 o MAGE A3 TCR o combinaciones de las mismas. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula linfocítica T citotóxica CD8+ seleccionada del grupo que consiste en células T CD8+ no modificadas, células T CD8+ de memoria central, células T CD8+ de memoria efectora y células T CD8+ a granel. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula linfocítica T colaboradora CD4+ que se selecciona del grupo que consiste en células T CD4+ no modificadas, células T CD4+ de memoria central, células T CD4+ de memoria efectora y células T CD4+ a granel. En algunas alternativas, las células son células T precursoras. En algunas alternativas, las células son células madre hematopoyéticas. En algunas alternativas, la composición comprende una célula huésped en un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas alternativas, la célula huésped comprende un sistema. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el dominio de unión al ligando es específico para un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento,

modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido al ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el segundo promotor es constitutivo o inducible. En algunas alternativas, el fármaco es el tamoxifeno y/o sus metabolitos. En algunas alternativas, el primer promotor comprende una secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 41. En algunas alternativas, el segundo promotor es un promotor constitutivo. En algunas alternativas, el segundo promotor es el EFlap. En algunas alternativas, el activador transcripcional comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 40. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además un primer vector y el segundo ácido nucleico comprende además un segundo vector. En algunas alternativas, ambos vectores se empaquetan en un vector viral. En algunas alternativas, el vector viral es un lentivirus. En algunas alternativas, el primer y segundo ácido nucleico comprenden un vector. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un marcador seleccionable. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el dominio de unión al ligando es específico para un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el primer promotor está en orientación opuesta al segundo promotor. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento de anticuerpo, preferiblemente un fragmento de unión del mismo. En algunas alternativas, la molécula específica del tumor es CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, CE7, EGFR, hB7H3, mesotelina, c-Met, PSMA, Her2, GD-2 o MAGE A3 TCR o combinaciones de las mismas. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica una citocina, un receptor de quimiocinas, un polipéptido que regula la apoptosis o un polipéptido que modula la señalización del punto de control; y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido al ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el segundo promotor es constitutivo o inducible. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, donde el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el primer promotor está en orientación opuesta al segundo promotor. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento de anticuerpo, preferiblemente un fragmento de unión del mismo. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento variable de cadena sencilla. En algunas alternativas, la molécula específica del tumor es CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, CE7, EGFR, hB7H3, mesotelina, c-Met, PSMA, Her2, GD-2 o MAGE A3 TCR o combinaciones de las mismas. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula linfocítica T citotóxica CD8+ seleccionada del grupo que consiste en células T CD8+ no modificadas, células T CD8+ de memoria central, células T CD8+ de memoria efectora y células T CD8+ a granel. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula linfocítica T colaboradora CD4+ que se selecciona del grupo que consiste en células T CD4+ no modificadas, células T CD4+ de memoria central, células T CD4+ de memoria efectora y células T CD4+ a granel. En algunas alternativas, la composición comprende una célula huésped en la que la célula huésped es una célula linfocítica T citotóxica CD8+ seleccionado del grupo que consiste en células T CD8+ no modificadas, células T CD8+ de memoria central, células T CD8+ de memoria efectora y células T CD8+ a granel y otra célula huésped en la que la célula huésped es una célula linfocítica T colaboradora CD4+ que se selecciona del grupo que consiste en células T CD4+ no modificadas, células T CD4+ de memoria central, células T CD4+ de memoria efectora y células T CD4+ a granel. En algunas alternativas, el cáncer es un tumor sólido o una neoplasia maligna hematológica. En algunas alternativas, el tumor sólido se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de cerebro, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer de próstata y cáncer de ovario. En algunas alternativas, el espaciador está optimizado para una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia. En algunas alternativas, la célula huésped es la célula T precursora. En algunas alternativas, la célula T precursora es una célula madre hematopoyética. En algunas alternativas, la célula huésped es la célula T precursora. En algunas alternativas, la célula T precursora es una célula madre hematopoyética. En algunas alternativas, el espaciador está optimizado para una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia. En algunas alternativas, la composición comprende una célula huésped en la que la célula huésped es una célula linfocítica T citotóxica CD8+ seleccionada del grupo que consiste en células T CD8+ no modificadas, células T CD8+ de memoria central, células T CD8+ de memoria efectora y células T CD8+ a granel o la célula huésped es una célula linfocítica T colaboradora CD4+ que se selecciona del grupo que consiste en células T CD4+ no modificadas, células T CD4+ de memoria central, células T CD4+ de memoria efectora y células T CD4+ a granel y una segunda célula huésped, en la que la segunda célula huésped es una célula T precursora o una célula madre hematopoyética.

En algunas alternativas, se proporciona un método para realizar inmunoterapia celular en un sujeto que tiene cáncer o una infección viral en el que el método comprende administrar una composición o una célula huésped al sujeto y

administrar un fármaco que induce la expresión de un transgén en la composición o las células huésped. En algunas alternativas, la célula huésped comprende un sistema. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el dominio de unión al ligando es específico para un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana; y b) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular; y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido al ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el segundo promotor es constitutivo o inducible. En algunas alternativas, el fármaco es el tamoxifeno y/o sus metabolitos. En algunas alternativas, el primer promotor comprende una secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 41. En algunas alternativas, el segundo promotor es un promotor constitutivo. En algunas alternativas, el segundo promotor es el EFlap. En algunas alternativas, el activador transcripcional comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 40. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además un primer vector y el segundo ácido nucleico comprende además un segundo vector. En algunas alternativas, ambos vectores se empaquetan en un vector viral. En algunas alternativas, el vector viral es un lentivirus. En algunas alternativas, el primer y segundo ácido nucleico comprenden un vector. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un marcador seleccionable. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el dominio de unión al ligando es específico para un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el primer promotor está en orientación opuesta al segundo promotor. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento de anticuerpo, preferiblemente un fragmento de unión del mismo. En algunas alternativas, la molécula específica del tumor es CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, CE7, EGFR, hB7H3, mesotelina, c-Met, PSMA, Her2, GD-2 o MAGE A3 TCR o combinaciones de las mismas. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica una citocina, un receptor de quimiocinas, un polipéptido que regula la apoptosis o un polipéptido que modula la señalización del punto de control; y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido al ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el segundo promotor es constitutivo o inducible. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el primer promotor está en orientación opuesta al segundo promotor. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento de anticuerpo, preferiblemente un fragmento de unión del mismo. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento variable de cadena sencilla. En algunas alternativas, la molécula específica del tumor es CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, CE7, EGFR, hB7H3, mesotelina, c-Met, PSMA, Her2, GD-2 o MAGE A3 TCR o combinaciones de las mismas. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula linfocítica T citotóxica CD8+ seleccionada del grupo que consiste en células T CD8+ no modificadas, células T CD8+ de memoria central, células T CD8+ de memoria efectora y células T CD8+ a granel. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula linfocítica T colaboradora CD4+ que se selecciona del grupo que consiste en células T CD4+ no modificadas, células T CD4+ de memoria central, células T CD4+ de memoria efectora y células T CD4+ a granel. En algunas alternativas, la composición comprende una célula huésped en un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas alternativas, la célula huésped comprende un sistema. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el dominio de unión al ligando es específico para un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido al ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el segundo promotor es constitutivo o inducible. En algunas alternativas, el fármaco es el tamoxifeno y/o sus metabolitos. En algunas alternativas, el primer promotor comprende una secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 41. En algunas alternativas, el segundo promotor es un promotor constitutivo. En algunas alternativas, el segundo promotor es el EFlap. En algunas alternativas, el activador transcripcional comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 40. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además un primer vector y el segundo ácido nucleico comprende además un segundo vector. En

algunas alternativas, ambos vectores se empaquetan en un vector viral. En algunas alternativas, el vector viral es un lentivirus. En algunas alternativas, el primer y segundo ácido nucleico comprenden un vector. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un marcador seleccionable. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el dominio de unión al ligando es específico para un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el primer promotor está en orientación opuesta al segundo promotor. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento de anticuerpo, preferiblemente un fragmento de unión del mismo. En algunas alternativas, la molécula específica del tumor es CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, CE7, EGFR, hB7H3, mesotelina, c-Met, PSMA, Her2, GD-2 o MAGE A3 TCR o combinaciones de las mismas. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica una citocina, un receptor de quimiocinas, un polipéptido que regula la apoptosis o un polipéptido que modula la señalización del punto de control; y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido al ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el segundo promotor es constitutivo o inducible. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el primer promotor está en orientación opuesta al segundo promotor. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento de anticuerpo, preferiblemente un fragmento de unión del mismo. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento variable de cadena sencilla. En algunas alternativas, la molécula específica del tumor es CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, CE7, EGFR, hB7H3, mesotelina, c-Met, PSMA, Her2, GD-2 o MAGE A3 TCR o combinaciones de las mismas. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula linfocítica T citotóxica CD8+ seleccionada del grupo que consiste en células T CD8+ no modificadas, células T CD8+ de memoria central, células T CD8+ de memoria efectora y células T CD8+ a granel. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula linfocítica T colaboradora CD4+ que se selecciona del grupo que consiste en células T CD4+ no modificadas, células T CD4+ de memoria central, células T CD4+ de memoria efectora y células T CD4+ a granel. En algunas alternativas, la composición comprende una célula huésped en la que la célula huésped es una célula linfocítica T citotóxica CD8+ seleccionada del grupo que consiste en células T CD8+ no modificadas, células T CD8+ de memoria central, células T CD8+ de memoria efectora y células T CD8+ a granel y otra célula huésped en la que la célula huésped es una célula linfocítica T colaboradora CD4+ que se selecciona del grupo que consiste en células T CD4+ no modificadas, células T CD4+ de memoria central, células T CD4+ de memoria efectora y células T CD4+ a granel. En algunas alternativas, la célula huésped es la célula T precursora. En algunas alternativas, la célula T precursora es una célula madre hematopoyética. En algunas alternativas, el espaciador está optimizado para una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia. En algunas alternativas, la composición comprende una célula huésped en la que la célula huésped es una célula linfocítica T citotóxica CD8+ seleccionada del grupo que consiste en células T CD8+ no modificadas, células T CD8+ de memoria central, células T CD8+ de memoria efectora y células T CD8+ a granel o la célula huésped es una célula linfocítica T colaboradora CD4+ que se selecciona del grupo que consiste en células T CD4+ no modificadas, células T CD4+ de memoria central, células T CD4+ de memoria efectora y células T CD4+ a granel y una segunda célula huésped, en la que la segunda célula huésped es una célula T precursora o una célula madre hematopoyética. En algunas alternativas, el cáncer se selecciona entre un tumor sólido o una neoplasia maligna hematológica. En algunas alternativas, el tumor sólido se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de cerebro, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer de próstata y cáncer de ovario. En algunas alternativas, el espaciador está optimizado para una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula T precursora. En algunas alternativas, la célula T precursora es una célula madre hematopoyética. En algunas alternativas, la población de linfocitos T aislados comprende células T precursoras. En algunas alternativas, las células T precursoras son células madre hematopoyéticas. En algunas alternativas, la administración del fármaco se realiza después de la administración de la composición o células huésped, en las que la administración se realiza 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 2 semanas, 4 semanas o dos meses, o cualquier período de tiempo entre dos valores de tiempo enumerados.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A muestra la expresión de ZsGreen y EGFRt determinada por citometría de flujo en células Jurkat transducidas con un constructo lentiviral de plásmido dual que incluye los constructos A y B en presencia o ausencia de 4 hidroxitamoxifeno (4-OHT). Los resultados muestran la expresión de EGFRt en presencia o ausencia de 4-OHT, lo que indica que las células portan el constructo A. Los resultados también muestran que las células portan el

constructo B a medida que se induce la expresión de ZsGreen en presencia de 4-OHT. La Figura 1B muestra el constructo A, que comprende el promotor constitutivo EFlap unido a TamR-tf (HEA3) unido a EGFRt, y el constructo B que comprende un promotor sintético 7xHBD/mE1b unido a un polinucleótido que codifica ZsGreen.

La Figura 2 muestra la expresión de ZsGreen en células Jurkat transducidas puestas en contacto con diferentes dosis de 4-OHT que varían de 50 a 1.000 nM.

La Figura 3 muestra la cinética de velocidad de activación y desactivación de la expresión de ZsGreen en células Jurkat transducidas con un único tratamiento de 48 horas de 4-OHT seguido de un lavado (○) y células Jurkat transducidas con un tratamiento de 24 horas de 4-OHT seguido de un lavado y luego una reestimulación con 4-OHT el día 15 (■).

La Figura 4A-D muestra la expresión de ZsGreen en células de memoria central CD4 transducidas con constructos lentivirales A y B de paquete dual. Las células se dividieron en 3 grupos de tratamiento, 4-OHT solo (Figura 4A), 4-OHT combinado con tratamiento conjunto de perlas CD3/CD28 (Figura 4B) o 4-OHT solo durante 48 horas, seguido de la adición de perlas CD3/CD28 (Figura 4C). La expresión de ZsGreen se controló durante 96 horas. La Figura 4D muestra el constructo A, que comprende el promotor constitutivo EFlap unido a TamR-tf (HEA3) unido a EGFRt, y el constructo B que comprende un promotor sintético 7xHBD/mE1b unido a un polinucleótido que codifica ZsGreen.

Las Figuras 5A-C muestran la expresión de ZsGreen en células de memoria central CD8 transducidas con constructos lentivirales A y B de paquete dual como se muestra en la Figura 4. Las células se dividieron en 3 grupos de tratamiento, 4-OHT solo (Figuras 5A), 4-OHT combinado con tratamiento conjunto de perlas CD3/CD28 (Figuras 5B) o 4-OHT solo durante 48 horas, seguido de la adición de perlas CD3/CD28 (Figuras 5C). La expresión de ZsGreen se controló durante 72 horas.

La Figura 6A muestra la expresión de EGFRt y Her2t en células T Jurkat humanas transducidas con los constructos A y B como se muestra en la Figura 6C. Se controló la expresión de EGFRt y Her2t en presencia o ausencia de 4-OHT. Las muestras se tiñeron con anticuerpo EGFRt-APC y Herceptina-biotina, seguido de SA-PE. La Figura 6B muestra una transferencia Western de células Jurkat parentales y células transducidas con CD19CAR teñidas con antiCD247 de ratón que reconoce la cadena zeta CD3 intracelular en CD19CAR (aproximadamente 48 kDa), la cadena zeta CD3 endógena ha migrado a 23 kDa. La cadena zeta CD3 endógena se detectó en todas las células. La cadena zeta CD3 de CD19CAR sólo se detectó en células Jurkat transducidas expuestas a 4-OHT. La Figura 6C muestra el constructo A, que comprende el promotor constitutivo EFlap unido a TamR-tf (HEA3) unido a EGFRt, y el constructo B que comprende un promotor sintético 7xHBD/mE1b unido a un polinucleótido que codifica CD19CAR unido a un polinucleótido que codifica Her2t.

La Figura 7A muestra la expresión de EGFRt y Her2t en células T Jurkat humanas transducidas con LV CD19CAR de TamR que incluye un marcador selectivo adicional, DHFRdm en presencia o ausencia de 4-OHT. Se controló la expresión de EGFRt y Her2t en presencia o ausencia de 4-OHT. Las muestras se tiñeron con anticuerpo EGFRt-APC y Herceptina-biotina, seguido por SA-PE. La Figura 7B muestra una transferencia Western de células Jurkat parentales y células transducidas con CD19CAR transducidas teñidas con antiCD247 de ratón que reconoce la cadena zeta CD3 intracelular en CARCD19 (aproximadamente 48 kDa), la cadena zeta CD3 endógena ha migrado a 23 kDa. La cadena zeta CD3 endógena se detectó en todas las células. La cadena zeta CD3 de CD19CAR sólo se detectó en células Jurkat transducidas expuestas a 4-OHT. La Figura 7C muestra el constructo A, que comprende el promotor constitutivo EFlap unido a TamR-tf (HEA3) unido a EGFRt, y el constructo B que comprende un promotor sintético 7xHBD/mE1b unido a un polinucleótido que codifica CD19CAR unido a un polinucleótido que codifica Her2t unido a un polinucleótido que codifica DHFRdm.

La Figura 8A muestra la expresión de EGFRt y Her2t en células T de memoria central CD4 humanas transducidas con LV CD19CAR de TamR que incluye un marcador selectivo adicional, DHFRdm en presencia o ausencia de 4-OHT y perlas antiCD3/CD28. La expresión de EGFRt y Her2t se controló en presencia o ausencia de 4-OHT y en presencia o ausencia de perlas antiCD3/CD28. Las muestras se tiñeron con anticuerpo EGFRt-APC y Herceptina-biotina, seguido de SA-PE. La Figura 8B muestra el constructo A, que comprende el promotor constitutivo EFlap unido a TamR-tf (HEA3) unido a EGFRt, y el constructo B que comprende un promotor sintético 7xHBD/mE1b unido a un polinucleótido que codifica CD19CAR unido a un polinucleótido que codifica Her2t unido a un polinucleótido que codifica DHFRdm.

Descripción detallada

Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la invención.

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

"Antígeno" o "Ag", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que provoca una respuesta inmune. Esta respuesta inmune puede implicar ya sea la producción de anticuerpos o la activación de células inmunológicamente competentes específicas, o ambas. Es fácilmente evidente que un antígeno puede ser generado, sintetizado, producir de forma recombinante o se puede derivar de una muestra biológica. Dicha muestra biológica

puede incluir, entre otros, una muestra de tejido, una muestra de tumor, una célula o un fluido biológico tal como, por ejemplo, sangre, plasma o líquido ascítico.

"Efecto antitumoral", como se usa en este documento, se refiere a un efecto biológico, que puede manifestarse por una disminución en el volumen del tumor, una disminución en el número de células tumorales, una disminución en el número de metástasis, un aumento en la esperanza de vida, o una disminución de varios síntomas fisiológicos asociados con la condición cancerosa. Un "efecto antitumoral" también se puede manifestar por una disminución en la recurrencia o un aumento en el tiempo antes de la recurrencia.

"Receptor quimérico", como se usa en este documento, se refiere a un receptor diseñado sintéticamente que comprende un dominio de unión al ligando de un anticuerpo u otra secuencia de proteína que se une a una molécula asociada con la enfermedad o trastorno y se une mediante un dominio espaciador a uno o más dominios de señalización intracelular de una célula T u otros receptores, tal como un dominio coestimulador. El receptor quimérico también puede denominarse como receptores de células T artificiales, receptores de células T quiméricos, inmunorreceptores quiméricos y receptores de antígenos quiméricos (CAR). Estos CAR son receptores modificados que pueden injertar una especificidad arbitraria en una célula receptora inmunitaria. Algunos investigadores también consideran que el término receptores de antígenos quiméricos o "CAR" incluye el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, el espaciador, el dominio de señalización y la región transmembrana. Sin embargo, debido a los sorprendentes efectos de modificar los diferentes componentes o dominios del CAR descritos en este documento, tal como la región de unión al epítipo (por ejemplo, fragmento de anticuerpo, scFv o parte del mismo, espaciador, dominio transmembrana y/o dominio de señalización), los componentes del CAR se distinguen frecuentemente a lo largo de esta divulgación en términos de elementos independientes. La variación de los diferentes elementos del CAR puede, por ejemplo, conducir a una afinidad de unión más fuerte por un epítipo o antígeno específico. "Dominio coestimulador", como se usa el término en este documento, se refiere a una fracción de señalización que proporciona a las células T una señal que, además de la señal primaria proporcionada por, por ejemplo, la cadena zeta CD3 del complejo TCR/CD3, media una respuesta de células T, que incluye, pero no se limita a, activación, proliferación, diferenciación, secreción de citocinas y similares. Un dominio coestimulador puede incluir todo o una parte de, pero no se limita a, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, ICOS, antígeno 1 asociado a la función de los linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 o un ligando que se une específicamente con 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 citocinas, y similares. "Codificar" como se usa en este documento se refiere a la propiedad de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, tal como un gen, un ADNc o un ARNm, para servir como moldes para la síntesis de otras macromoléculas tal como una secuencia definida de aminoácidos. Por lo tanto, un gen codifica una proteína si la transcripción y traducción del ARNm correspondiente a ese gen produce 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.

"Condicional" o "Inducible", como se usa en este documento, se refiere a un constructo de ácido nucleico que incluye un promotor que proporciona la expresión génica en presencia de un inductor y no proporciona sustancialmente la expresión génica en ausencia del inductor.

"Constitutivo", como se usa en este documento, se refiere al constructo de ácido nucleico que incluye un promotor que es constitutivo que proporciona la expresión de un polipéptido que se produce continuamente.

"Específico" o "Especificidad" puede referirse a la característica de un ligando para la pareja de unión o alternativamente, la pareja de unión para el ligando, y puede incluir la forma complementaria, carga y especificidad hidrófoba para la unión. La especificidad para la unión puede incluir estereoespecificidad, regioselectividad y quimioselectividad. En algunas alternativas, se proporciona un método para fabricar un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico de manera que se genera un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico.

"Regular" o "modular" como se describe en el presente documento, se refiere al acto de controlar un proceso biológico, o de ejercer una influencia modificadora o controladora sobre un proceso o ruta biológico o celular. En algunas alternativas, se proporciona un sistema para la expresión inducible de un receptor de antígeno quimérico, en el que el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el dominio de unión al ligando es específico para un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito, un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado, un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana, y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular, y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido al ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, la modulación comprende la modulación de la diferenciación celular y la apoptosis. En algunas alternativas, la modulación comprende la modulación de la proliferación celular mediante la regulación de la actividad

de las proteínas. En algunas alternativas, las proteínas son reguladores del ciclo celular y factores de transcripción. En algunas alternativas, los reguladores del ciclo celular son ciclina D1, p21, p27 y/o cdc25A. En algunas alternativas, los factores de transcripción son c-Myc.

5 "Linfocito T citotóxico" (CTL), como se usa en este documento, se refiere a un linfocito T que expresa CD8 en su superficie (por ejemplo, una célula T CD8+). En algunas alternativas, tales células son preferiblemente células T de "memoria" (células T_M) que experimentan antígenos.

10 La célula T de "memoria central" (o "T_{CM}") como se usa en este documento se refiere a un CTL que experimenta un antígeno que expresa CD62L, CCR-7 y/o CD45RO en su superficie, y no expresa o tiene una expresión disminuida de CD45RA, en comparación con las células no modificadas. En algunas alternativas, las células de memoria central son positivas para la expresión de CD62L, CCR7, CD28, CD127, CD45RO y/o CD95, y pueden tener una expresión disminuida de CD54RA, en comparación con las células no modificadas. Célula T de "memoria efectora" (o "T_{EM}"), como se usa en este documento, se refiere a una célula T que experimenta un antígeno que no expresa o tiene una expresión disminuida de CD62L en su superficie, en comparación con las células de memoria central, y no expresa o tiene una expresión disminuida de CD45RA, en comparación con células no modificadas. En algunas alternativas, las células de memoria efectoras son negativas para la expresión de CD62L y/o CCR7, en comparación con las células no modificadas o las células de memoria central, y pueden tener una expresión variable de CD28 y/o CD45RA.

20 Las células T "no modificadas" como se usan en este documento se refieren a un linfocito T que no ha experimentado un antígeno que expresa CD62L y/o CD45RA, y que no expresa CD45RO-, en comparación con las células de memoria centrales o efectoras. En algunas alternativas, los linfocitos T CD8+ no modificados se caracterizan por la expresión de marcadores fenotípicos de células T no modificadas, que incluyen CD62L, CCR7, CD28, CD127 y/o CD45RA.

25 Células T "efectoras", "T_E" como se usan en el presente documento, se refieren a células linfocíticas T citotóxicas que experimentan antígenos que no expresan o tienen una expresión disminuida de CD62L, CCR7 y/o CD28, y son positivas para granzima B y/o perforina, en comparación con las células T de memoria central o no modificadas.

30 "Enriquecido" y "empobrecido", como se usa en el presente documento para describir cantidades de tipos de células en una mezcla, se refiere al sometimiento de la mezcla de células a un proceso o etapa, que da como resultado un aumento en el número del tipo "enriquecido" y una disminución en el número de las 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 60, 70, 80, 90, 95 o 99 por ciento o más (en el número o recuento) del de las células "enriquecidas" y/o 40, 30, 20, 10, 5 o 1 por ciento o menos (en el número o recuento) de las células "empobrecidas".

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

40 "Aislado", cuando se usa para describir los diversos polipéptidos divulgados en este documento, significa un polipéptido o ácido nucleico que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Preferiblemente, el polipéptido o ácido nucleico aislado está libre de asociación con todos los componentes con los que está asociado de forma natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que normalmente interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del polipéptido o ácido nucleico, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos.

45 "Dominio de señalización intracelular", como se usa en el presente documento, se refiere a toda o una parte 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 la proliferación, diferenciación, activación y otras funciones efectoras. En algunas alternativas, tales moléculas incluyen todo o porciones de CD28, CD3 o 4-1BB, o combinaciones de los mismos.

50 "Ligando", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que se une específicamente a otra sustancia para formar un complejo. Los ejemplos de ligandos incluyen epítipos sobre antígenos, moléculas que se unen a receptores, sustratos, inhibidores, hormonas y/o activadores. "Dominio de unión al ligando", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia o porción de una sustancia que se une a un ligando. Los ejemplos de dominios de unión al ligandos incluyen porciones de anticuerpos que se unen a antígenos, dominios extracelulares de receptores y/o sitios activos de enzimas. "Operativamente unido", como se usa en el presente documento, se refiere al enlace funcional entre una secuencia reguladora y una secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que da como resultado la expresión de esta última. Por ejemplo, una primera secuencia de ácidos nucleicos está operativamente enlazada con 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 operativamente unido a una secuencia codificante si el promotor afecta la transcripción o expresión de la secuencia

codificante. Generalmente, las secuencias de ADN operativamente enlazadas son contiguas y, cuando es necesario para unir dos regiones codificantes de proteínas, están en el mismo marco de lectura.

El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a las secuencias de polipéptidos del receptor quimérico identificadas en este documento se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia de referencia para cada uno del dominio de unión al ligando, espaciador, dominio transmembrana y/o dominio activador de linfocitos, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación con el propósito de determinar el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos se puede lograr de varias formas que están dentro de la experiencia en la técnica, por ejemplo, usando software informático disponible públicamente tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (ADNSTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, incluidos los algoritmos necesarios para lograr la alineación máxima 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)] utiliza varios parámetros de búsqueda, la mayoría de los cuales se establecen como valores predeterminados. Aquellos que no están configurados como 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) = 11 y matriz de puntuación = BLOSUM62. Un % del valor de identidad de secuencia de aminoácidos se determina dividiendo (a) el número de residuos de aminoácidos idénticos coincidentes entre cada una o todas las secuencias de aminoácidos del polipéptido de la secuencia del receptor quimérico de referencia proporcionada en la Tabla 2 y la secuencia de aminoácidos de comparación de interés determinado por WU-BLAST-2 por (b) el número total de residuos de aminoácidos del polipéptido de interés. En algunas alternativas, el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos se determina mediante software informático.

"Polinucleótido variante del receptor quimérico" o "secuencia de ácidos nucleicos variantes del receptor quimérico" como se usa en este documento se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido como se define a continuación que tiene al menos 80%, 85%, 90% o 95% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos (o un porcentaje de identidad de secuencia de ácidos nucleicos dentro de un intervalo definido por dos cualesquiera de los porcentajes mencionados anteriormente) con la secuencia de ácido polinucleotídico que se muestra en la Tabla 1 o un fragmento derivado específicamente de la misma, tal como un polinucleótido que codifica un dominio de unión a antígeno, un polinucleótido que codifica un dominio espaciador, un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana y/o un polinucleótido que codifica un dominio estimulante de linfocitos. Normalmente, una variante de receptor quimérico de polinucleótido o fragmento del mismo tendrá al menos 80% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, más preferiblemente al menos 81% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, más preferiblemente al menos 82% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, más preferiblemente al menos 83% identidad de secuencia de ácidos nucleicos, más preferiblemente al menos 84% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, más preferiblemente al menos 85% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, más preferiblemente al menos 86% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, más preferiblemente al menos 87% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, más preferiblemente al menos 88% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, más preferiblemente al menos 89% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, más preferiblemente al menos 90% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, más preferiblemente al menos 91% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, más preferiblemente al menos 92% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, más preferiblemente al menos 93% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, más preferiblemente al menos 94% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, más preferiblemente al menos 95% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, más preferiblemente al menos 96% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, más preferiblemente al menos 97% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, más preferiblemente al menos 98% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos y aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos con la secuencia de ácidos nucleicos como se muestra en la Tabla o un fragmento derivado de la misma. Las variantes no abarcan la secuencia de nucleótidos nativa. En este sentido, debido a la degeneración del código genético, un experto en la técnica reconocerá inmediatamente que un gran número de polinucleótidos variantes del receptor quimérico que tienen al menos un 80% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos con la secuencia de nucleótidos de la Tabla 1 codificará un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de la Tabla 2.

"Sustancialmente purificada" se refiere a una molécula que tiene 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1% o menos de otros tipos de moléculas u otros tipos de células. 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 de células sustancialmente purificadas 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 las 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 el células. En algunas alternativas, no encontrado sustancialmente significa que el antígeno

o molécula se encuentra en menos del 50% del tipo de célula normal y/o en un 50% menos de densidad en comparación con la cantidad de células o antígeno que se encuentra en una célula tumoral u otra célula enferma.

- 5 Las "células T" o "linfocitos T", como se usan en este documento, pueden ser de cualquier especie de mamífero, preferiblemente especie de primate, incluidos monos, perros y seres humanos. En algunas alternativas, las células T son alogénicas (de la misma especie, pero de diferente donante) que el sujeto receptor; en algunas alternativas, las células T son autólogas (el donante y el receptor son el mismo); en algunas alternativas, las células T son singénicas (el donante y los receptores son diferentes, pero son gemelos idénticos).
- 10 El "vector" o "constructo" es un ácido nucleico utilizado para introducir ácidos nucleicos heterólogos en una célula que tiene elementos reguladores para proporcionar la expresión de los ácidos nucleicos heterólogos en la célula. Los vectores incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, minicírculos, levaduras y genomas virales. En algunas alternativas, los vectores son plásmidos, minicírculos, levaduras o genomas virales.
- 15 La "apoptosis", como se describe en el presente documento, se refiere al proceso de muerte celular programada (PCD) que puede ocurrir en organismos multicelulares. Los eventos bioquímicos conducen a cambios celulares característicos (morfología) y muerte. Estos cambios incluyen ampollas, encogimiento celular, fragmentación nuclear, condensación de cromatina y fragmentación del ADN cromosómico. En la apoptosis, una célula inicia la señalización apoptótica intracelular en respuesta a un estrés, que puede provocar el suicidio celular. La unión de receptores nucleares por glucocorticoides, calor, radiación, privación de nutrientes, infección viral, hipoxia y aumento de la concentración de calcio intracelular, por ejemplo, por daño a la membrana, pueden desencadenar la liberación de señales apoptóticas intracelulares por una célula dañada. Varios componentes celulares, tales como la poli ADP ribosa polimerasa, también pueden ayudar a regular la apoptosis.
- 20 Antes de que las enzimas precipiten el proceso real de muerte celular, las señales apoptóticas deben hacer que las proteínas reguladoras inicien la vía de la apoptosis. Esta etapa permite que las señales apoptóticas provoquen la muerte celular, o que el proceso se detenga, si la célula ya no necesita morir. Varias proteínas están involucradas, pero se han identificado dos métodos principales de regulación: dirigirse a la funcionalidad de las mitocondrias o transducir directamente la señal a través de proteínas adaptadoras a los mecanismos apoptóticos. Otra vía extrínseca para la iniciación identificada en varios estudios de toxinas es un aumento en la concentración de calcio dentro de una célula causado por la actividad del fármaco, que también puede causar apoptosis a través de una proteasa de unión a calcio, calpaina.
- 25 La apoptosis puede regularse por muchos factores. Estos factores pueden incluir, entre otros, genes que pueden expresar quimeras de IL-2, IL-15, receptores de quimiocinas, Bcl2, CA-Akt, dn-TGFbetaRIII, dn-SHP1/2 y/o PD-1CD28. IL-15 regula la activación y proliferación de las células T y de las células asesinas naturales. En linfocitos de roedores, se demostró que IL15 previene la apoptosis al inducir un inhibidor de la apoptosis, BCL2L1/BCL-X (L). En humanos con enfermedad celíaca, IL-15 suprime de manera similar la apoptosis en los linfocitos T al inducir Bcl-2 y/o BCL-xL. Bcl-2 (linfoma 2 de células B), codificado en humanos por el gen BCL2, es el miembro fundador de la familia Bcl-2 de proteínas reguladoras que regulan la muerte celular (apoptosis), ya sea induciéndola (proapoptótica) o inhibiéndola (anti-apoptótica). Bcl-2 se considera específicamente como una proteína antiapoptótica importante y, por lo tanto, se clasifica como un oncogén. La proteína quinasa B (PKB), también conocida como Akt, es una proteína quinasa específica de serina/treonina que desempeña un papel clave en múltiples procesos celulares como el metabolismo de la glucosa, la apoptosis, la proliferación celular, la transcripción y la migración celular. En algunas alternativas, se proporciona un sistema para la expresión inducible del receptor de antígeno quimérico, en el que el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica una citocina, un receptor de quimiocina, un polipéptido que regula la apoptosis, o un polipéptido que modula la señalización del punto de control y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor constitutivo o inducible unido operativamente a un ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el polipéptido que regula la apoptosis o modula la señalización del punto de control comprende quimeras de IL-2, IL-15, receptores de quimiocinas, Bcl2, CA-Akt, dn-TGFbetaRIII, dn-SHP1/2 o PD-1CD28.
- 35 La "señalización del punto de control", como se describe en el presente documento, bloquea el ciclo celular en puntos de transición específicos, puntos de control para garantizar que los eventos del ciclo celular se lleven a cabo en el orden correcto. También se puede activar la señalización del punto de control. A modo de ejemplo y no de limitación, la señalización del punto de control puede ocurrir por daño al ADN de modo que el ciclo celular no tenga que continuar hasta que el daño sea reparado. Los "puntos de control del ciclo celular" son mecanismos de control en las células eucariotas que aseguran la división adecuada de la célula. Cada punto de control sirve como un punto de parada potencial a lo largo del ciclo celular, durante el cual se evalúan las condiciones de la célula, y la progresión a través de las diversas fases del ciclo celular se produce cuando se cumplen las condiciones favorables. Actualmente, hay tres puntos de control conocidos: el punto de control G1, también conocido como el punto de control de restricción o de inicio; el punto de control G2/M; y el punto de control de la metafase, también conocido como el punto de control del husillo. Las vías bioquímicas que restringen la transición del ciclo celular y/o inducen la muerte celular después del estrés se conocen como puntos de control del ciclo celular. Estos puntos de control mantienen la fidelidad de la
- 60
- 65

replicación, reparación y división del ADN. Los polipéptidos que pueden regular la señalización del punto de control pueden incluir, pero no se limitan a, p53, p107, p130 y el represor transcripcional Rb.

"Reguladores de puntos de control negativos", como se describe en el presente documento, se refiere a factores que pueden restringir la capacidad de las respuestas de las células T para atacar eficazmente los tumores. También se les conoce como señalización negativa de puntos de control. En algunas alternativas, se proporciona un sistema para la expresión inducible del receptor de antígeno quimérico, en el que el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica una citocina, un receptor de quimiocina, un polipéptido que inhibe y regula la apoptosis, o un polipéptido que modula la señalización del punto de control y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor constitutivo o inducible unido operativamente a un ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el polipéptido que modula la señalización del punto de control inhibe los reguladores de puntos de control negativos. En algunas alternativas, el regulador de punto de control negativo comprende VISTA, LAG-3 y/o TIM3.

En otro ejemplo, los inhibidores del ciclo celular que median las señales inhibitorias del crecimiento de las rutas de señalización secuencia arriba, los inhibidores de ciclina-CDK de la familia Cip/Kip p21Cip1, p27Kip1 y p57Kip2 han surgido como proteínas multifacéticas con funciones más allá de la regulación del ciclo celular. Además de regular el ciclo celular, las proteínas Cip/Kip también pueden desempeñar funciones importantes en la apoptosis, la regulación transcripcional, la determinación del destino celular, la migración celular y la dinámica citoesquelética. Una red de fosforilación compleja modula las funciones de las proteínas Cip/Kip al alterar su localización subcelular, interacciones proteína-proteína y estabilidad. Estas funciones son esenciales para el mantenimiento de la homeostasis normal de células y tejidos, en procesos que van desde el desarrollo embrionario hasta la supresión de tumores. En algunas alternativas, se proporciona un sistema para la expresión inducible del receptor de antígeno quimérico, en el que el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica una citocina, un receptor de quimiocina, un polipéptido que regula la apoptosis, o un polipéptido que modula la señalización del punto de control y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor constitutivo o inducible unido operativamente a un ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el polipéptido modula la señalización del punto de control. En algunas alternativas, el polipéptido que modula la señalización del punto de control inhibe los reguladores de puntos de control negativos. En algunas alternativas, el regulador del punto de control negativo comprende VISTA, LAG-3 y/o TIM3.

"Precursores de células T", como se describe en el presente documento, se refiere a células precursoras linfoides que pueden migrar al timo y convertirse en precursores de células T, que no expresan un receptor de células T. Todas las células T se originan a partir de células madre hematopoyéticas en la médula ósea. Los progenitores hematopoyéticos (células progenitoras linfoides) de las células madre hematopoyéticas pueblan el timo y se expanden por división celular para generar una gran población de timocitos inmaduros. Los primeros timocitos no expresan ni CD4 ni CD8 y, por lo tanto, se clasifican como células doble negativas (CD4⁻CD8⁻). A medida que avanzan en su desarrollo, se convierten en timocitos doble positivos (CD4⁺CD8⁺) y finalmente maduran hasta timocitos simple positivos (CD4⁺CD8⁻ o CD4⁻CD8⁺) que luego se liberan del timo a los tejidos periféricos.

Aproximadamente el 98% de los timocitos mueren durante los procesos de desarrollo en el timo al fallar la selección positiva o la selección negativa, mientras que el otro 2% sobrevive y deja el timo para convertirse en células T inmunocompetentes maduras.

La etapa doble negativa (DN) de la célula T precursora 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 células T $\alpha\beta$ funcional. A medida que el timocito en desarrollo progresa a través de las cuatro etapas DN (DN1, DN2, DN3 y DN4), la célula 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 el reordenamiento de la cadena β (y silencian el alelo alternativo) y dan como resultado la proliferación de la célula. Aunque estas señales requieren este TCR previo en la superficie celular, dependen de la unión del ligando al TCR previo. Estos timocitos luego expresarán tanto CD4 como CD8 y progresarán a la etapa doble positiva (DP) en la que tiene lugar 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 (como, por ejemplo, células T, células B, células 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).

Esta divulgación proporciona un sistema que tiene un componente inducible para la expresión de transgenes y un componente constitutivo para la expresión de transgenes. El sistema se puede adaptar para proporcionar la expresión regulada de uno o más transgenes para proporcionar características funcionales en las células transducidas.

En algunas alternativas, un transgén bajo el control del promotor inducible es un receptor de antígeno quimérico (CAR). El promotor inducible proporciona la capacidad de terminar la expresión de CAR en las células mientras proporciona la reactivación de las células en una fecha posterior (por ejemplo, en el caso de una recaída). Además, el ciclo de las células T CAR a través de períodos de activación y desactivación puede minimizar el agotamiento y/o la anergia debido a la estimulación crónica de los receptores de las células T.

El diseño de los vectores también proporciona transgenes adicionales que pueden mejorar una o más características funcionales de las células transducidas, tales como potencia tumoral mejorada, supervivencia y proliferación de células transducidas. En algunas alternativas, estos transgenes están bajo el control de un promotor inducible. Dichos transgenes incluyen, sin limitación, genes que promueven la supervivencia y la proliferación, genes que previenen la apoptosis y genes que regulan la señalización del punto de control. Dichos genes incluyen genes que codifican quimeras de IL-2, IL-15, receptores de quimiocinas, Bcl2, CA-Akt, dn-TGFbetaRIII, dn-SHP1/2 y/o PD-1CD28. En algunas alternativas, los transgenes son genes que codifican quimeras de IL-2, IL-15, receptores de quimiocinas, Bcl2, CA-Akt, dn-TGFbetaRIII, dn-SHP1/2 y/o PD-1CD28. En algunas alternativas, el gen que modula la señalización de los puntos de control codifica un polipéptido que inhibe los reguladores de puntos de control negativos. En algunas alternativas, el regulador de punto de control negativo comprende VISTA, LAG-3 y/o TIM3.

La divulgación proporciona un sistema que comprende un primer y un segundo ácido nucleico, y vectores y células huésped que incluyen dichos ácidos nucleicos. Cada uno de los ácidos nucleicos primero y segundo comprende una serie de componentes modulares que se pueden cortar y reemplazar con otros componentes con el fin de personalizar el sistema para una célula diana específica. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico incluye un promotor inducible para el control de la expresión de los genes (por ejemplo, un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico) en forma de activación y desactivación según sea necesario. En otras alternativas, el segundo ácido nucleico comprende un promotor constitutivo que proporciona la expresión de un activador transcripcional. En algunas alternativas, el gen codifica un receptor de antígeno quimérico.

Sistema inducible

La divulgación proporciona un sistema útil para proporcionar expresión regulada de transgenes en células. Dichos transgenes incluyen, sin limitación, receptores de células T, receptores de células T maduras por afinidad, receptores de antígenos quiméricos, receptores de quimiocinas, citocinas, genes que inhiben la apoptosis y/o genes que modulan la señalización del punto de control. En algunas alternativas, el polipéptido que modula la señalización del punto de control inhibe los reguladores de puntos de control negativos. En algunas alternativas, el regulador de punto de control negativo comprende VISTA, LAG-3 y/o TIM3. En algunas alternativas, el sistema contiene varios componentes modulares que facilitan la sustitución de elementos del ácido nucleico. En algunas alternativas del sistema, el sistema regula la expresión de transgenes en las células. En algunas alternativas, los transgenes codifican receptores de células T, receptores de células T maduras por afinidad, receptores de antígenos quiméricos, receptores de quimiocinas, citocinas, genes que regulan la apoptosis y/o genes que modulan la señalización del punto de control. En algunas alternativas, el gen que modula la señalización del punto de control codifica un polipéptido que inhibe los reguladores de los puntos de control negativos. En algunas alternativas, el regulador de punto de control negativo comprende VISTA, LAG-3 y/o TIM3.

En algunas alternativas, un sistema para la expresión inducible de un receptor de antígeno quimérico comprende: un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico, el receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el dominio de unión al ligando es específico para un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular; y un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido al ácido nucleico que codifica un modulador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el segundo promotor es constitutivo o inducible.

En algunas alternativas, un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico comprende un polinucleótido que codifica un dominio de unión al ligando, en el que la molécula diana es un antígeno específico de tumor, un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico en el que el espaciador está optimizado; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana; y un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, un vector de expresión comprende un primer y/o un segundo ácido nucleico, como se describe en el presente documento. También se incluyen en el presente documento polipéptidos codificados por todos o una parte de los ácidos nucleicos del receptor quimérico.

En otras alternativas, un primer ácido nucleico comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica un gen que promueve la supervivencia y proliferación celular, un gen que regula la apoptosis y/o un gen que modula la señalización del punto de control. Dichos genes incluyen genes que codifican quimeras de IL-2, IL-15, receptores de quimiocinas, Bcl2, CA-

Akt, dn-TGFBetaRIII, dn-SHP1/2 y/o PD-1CD28. En algunas alternativas, el gen que modula la señalización del punto de control codifica un polipéptido que inhibe los reguladores del punto de control negativos. En algunas alternativas, el regulador de punto de control negativo comprende VISTA, LAG-3 y/o TIM3.

5 Promotores Inducibles

Un sistema comprende un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco. Utilizando un promotor inducible, la expresión transgénica se puede activar y desactivar para evitar efectos secundarios tóxicos y/o permitir que las células descansen durante la remisión. Aunque se conocen varios sistemas de promotores inducibles, la aplicabilidad clínica de estos sistemas es limitada debido a efectos tóxicos fuera del objetivo, biodistribución desfavorable y perfiles farmacodinámicos, intervalo dinámico de salida limitado y/o disponibilidad limitada como productos farmacéuticos disponibles comercialmente aprobados por la FDA. Además, muchos de estos sistemas utilizan reguladores transcripcionales quiméricos contruidos a partir de componentes xenogénicos, lo que introduce la complicación de la inmunogenicidad al aplicar estos sistemas a la terapéutica humana.

En algunas alternativas, un primer promotor es inducible por un fármaco. El fármaco se selecciona en función de su historial de seguridad, perfil farmacocinético favorable, distribución tisular, un bajo coeficiente de partición entre el espacio extracelular y el citosol, baja inmunogenicidad, baja toxicidad y/o alta expresión en linfocitos. En una alternativa específica, se selecciona un fármaco que está aprobado por la FDA, proporciona expresión transgénica en linfocitos, no activa otra expresión génica indeseable e induce un promotor que no contiene ningún componente xenogénico. En algunas alternativas, el promotor inducible es activado por un activador transcripcional que interactúa con un fármaco. El activador transcripcional se activa o puede unirse y activar el promotor inducible en presencia del fármaco.

Una alternativa específica de un fármaco es un fármaco que se une a un dominio de unión al ligando del receptor de estrógeno de un activador transcripcional. En algunas alternativas, el fármaco incluye tamoxifeno, sus metabolitos, análogos y sales y/o hidratos o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

El tamoxifeno, CAS RN 10540-29-1, también se conoce como 2-(4-((1Z)-1,2-difenil-1-butenil)fenoxi)-N,N-dimetiletanamina o (Z)-2-(para-(1,2-difenil-1-butenil)fenoxi)-N,N-dimetilamina (IUPAC), y tiene una fórmula molecular de $C_{26}H_{29}NO$, PM 371,52. El tamoxifeno es un modulador selectivo del receptor de estrógeno con actividades específicas de tejido. El tamoxifeno actúa como un agente anti-estrógeno (agente inhibidor) en el tejido mamario, pero como un estrógeno (agente estimulante) en el metabolismo del colesterol, la densidad ósea y la proliferación celular en el endometrio. El tamoxifeno se administra con frecuencia por vía oral como una sal farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, el citrato de tamoxifeno (RN 54965-24-1, PM 563,643) está indicado para el tratamiento del cáncer de mama metastásico y como adyuvante para el tratamiento del cáncer de mama en mujeres después de una disección axilar de mastectomía e irradiación de mama. El citrato de tamoxifeno también está indicado para reducir la incidencia de cáncer de mama en mujeres con alto riesgo de cáncer de mama.

Metabolitos del tamoxifeno en pacientes con cáncer de mama de rata, ratón y ser humano, incluidos los metabolitos principales N-desmetiltamoxifeno (RN 31750-48-8, PM 357,494) y 4-hidroxitamoxifeno (4-OHT) (RN 68392-35-8, PM 387,52, afimoxifeno), se divulgan en Robinson et al., Metabolites, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of tamoxifen in rats and mice compared to the breast cancer patient. Drug Metab Dispos. Enero de 1991; 19: 36-43. Otros metabolitos del citocromo P-450 se divulgan en Crewe et al., 2002, incluidos cis-4-hidroxitamoxifeno (RN 174592, PM 387,52; afimoxifeno, isómero E) y 4'-hidroxitamoxifeno ((Z)-4-(1-(4-(2-(dimetilamino)etoxi)fenil)-1-fenilbut-1-en-2-il)fenol) Véase Crewe et al., 2002, Metabolism of Tamoxifen by recombinant human cytochrome P-450 enzymes: Formation of the 4-hydroxy, 4'-hydroxy and N-desmethyl metabolites and isomerization of trans-4-hydroxytamoxifen, Drug Metab Dispos, 30(8): 869-874, Figura 1.

Los compuestos con similitud estructural con el tamoxifeno incluyen, entre otros, cis-tamoxifeno (RN 13002-65-8, PM 371,521), 4-metiltamoxifeno (RN 73717-95-5, PM 385,548), N-desmetiltamoxifeno (RN 31750-48-8, PM 357,494), (Z)-desetil metil tamoxifeno (RN 15917-50-7, PM 357,494), (E)-desetil metil tamoxifeno (RN 31750-45-5, PM 357,494), trans-4-hidroxitamoxifeno (RN 68047-06-3, PM 387,52), afimoxifeno (RN 68392-35-8, PM 387,52, 4-hidroxitamoxifeno), afimoxifeno, isómero E (RN 174592-47-3, PM 387,52), 4-clorotamoxifeno (RN 77588-46-6, PM 405,966), 4-fluorotamoxifeno (RN 73617-96-6, PM 389,511), Toremifeno (RN 89778-26-7, PM 405,966), desetil tamoxifeno (RN 19957-51-8, PM 343,47), (E)-desetil tamoxifeno (RN 97151-10-5, PM 343,47), (Z)-desetil tamoxifeno (RN 97151-11-6, PM 343,47), Miproxifeno (RN 129612-87-9, PM 429,6), 2-(p-(beta-etil-alfa-fenilestiril)fenoxi) trietilamina (RN 749-86-0, PM 399,575), Droloxifeno (RN 82413-20-5, PM 387,52), 4 -yodo- tamoxifeno (RN 116057-68-2, PM 497,413), dihidrotamoxifeno (RN 109640-20-2, PM 373,537), (E)-N,N-dimetil-2-(4-(1-(2-metilfenil)- 2-fenil-1-butenil)fenoxi)etanamina (RN 97150-96-4, PM 385,548) o 4-hidroxitoremifeno (RN 110503-62-3, PM 421,965); y/o sales y/o hidratos o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Por ejemplo, las sales citrato de tamoxifeno, o las sales citrato de compuestos con similitud estructural al tamoxifeno, incluyen, pero no se limitan a, citrato de tamoxifeno (RN 54965-24-1, PM 563,64), citrato de 2-(p-(1,2-difenil-1-butenil)fenoxi)-N,N-dimetiletetilamina (RN 7244-97-5, PM 563,64), citrato de (E)-tamoxifeno (RN 76487-65-5, PM 563,64),

citrato de toremifeno (RN 89778-27-8, PM 598,088), citrato de droloxifeno (RN 97752-20-0, PM 579,64), citrato de 2-(p-(1,2-bis(p-metoxifenil)-1-butenil)fenoxi)trietilamina (RN 42920-39-8, PM 651,748), 2-hidroxi-1,2,3-propano tricarboxilato de 2-(4-(1,2-difeniletetil)fenoxi)-N,N-dietil-etanamina (RN 40297-42 -5, PM 563,643), citrato de 2-(p-(alfa-fenilestiril)fenoxi)trietilamina (RN 102433-95-4, PM 563,64), citrato de 2-(p-(2-(p-metoxifenil)-1-fenilo-1-butenil)fenoxi)trietilamina (1:1) (RN 42824-34-0, PM 637,72), citrato de 2-(p-(1-(p-metoxifenil)-2-fenil propenil)fenoxi)trietilamina (RN 13554-24-0, PM 607,696), citrato monohidratado de 2-(p-(alfa-(p-metoxifenil)estiril)fenoxi)trietilamina (RN 13542-71-7, PM 593,669), citrato de 2-(p-(p-metoxi-alfa-fenilfenetil)fenoxi)trietilamina (RN 16421-72-0, PM 595,685), citrato de alcohol alfa-(p-(2-(dietilamino)etoxi)fenil)-beta-etil-p-metoxi-alfa-fenilfenetilico (1:1) (RN 35263-93-5, PM 639,737), citrato de 1-p-(2-(dietilamino)etoxi)fenil)-2-(p-metoxifenil)-1-feniletanol (PM 611,68), citrato de alcohol alfa-p-(2-(dietilamino)etoxi)fenil)-beta-etil-alfa-(p-hidroxifenil)-p-metoxifenetilico (RN 35263-96-8, PM 655,737), y/o citrato de 2-(p-(p-metoxi-alfa-metilfenetil)fenoxi)-trietilamina (RN 15624-34-7, PM 533,614).

En algunas alternativas, una cantidad afectiva del fármaco para inducir la expresión es una cantidad que proporciona un aumento en la expresión transgénica sobre el nivel de expresión no inducido y/o basal. En algunas alternativas, esta cantidad se puede determinar fácilmente usando dosis conocidas y perfil farmacocinético del fármaco.

En algunas alternativas, el promotor inducible tiene un nivel bajo de actividad basal. Cuando se usa un vector lentiviral, el nivel de actividad basal en las células no inducidas es del 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% o menos, en comparación con cuando las células se inducen a expresar el gen. El nivel de actividad basal se puede determinar midiendo la cantidad de expresión del transgén (por ejemplo, gen marcador) en ausencia del inductor (por ejemplo, fármaco) usando citometría de flujo.

En algunas alternativas, el promotor inducible proporciona un alto nivel de actividad inducida, en comparación con la actividad no inducida o basal. En algunas alternativas, el nivel de actividad en el estado inducido es 2, 4, 6, 8 o 10 veces mayor que el nivel de actividad en el estado no inducido. En algunas alternativas, la expresión del transgén bajo el control del promotor inducible se apaga en ausencia de un transactivador en menos de 10, 8, 6, 4, 2 o 1 días excluyendo 0 días.

En algunas alternativas, se puede diseñar y/o modificar un promotor inducible para proporcionar un bajo nivel de actividad basal, un alto nivel de inducibilidad y/o un corto tiempo de reversibilidad. En algunas alternativas, el promotor inducible es el promotor 7xHBD/mE1b. En la Tabla 12 se encuentra un ejemplo de una secuencia para el promotor (SEQ ID NO: 41). Por ejemplo, en el promotor 7xHBD/mE1b, se pueden realizar mutaciones para mejorar la unión del activador transcripcional.

En algunas alternativas, el sistema emplea un activador transcripcional sintético que, en presencia del fármaco (por ejemplo, tamoxifeno), se une a un promotor sintético secuencia arriba de un transgén para inducir la expresión. En algunas alternativas, el activador transcripcional es TamR-tf (HEA3). El factor de transcripción regulado por tamoxifeno ("TamR-tf, también denominado HEA3") es un factor de transcripción quimérico compuesto de subunidades humanas, incluido el dominio de unión al ADN del extremo terminal N del factor nuclear de hepatocitos 1-alfa (HNF-1α) (por ejemplo, aminoácidos 1-281 de la SEQ ID NO: 40) fusionado en marco al dominio mutante de unión al ligando específico de tamoxifeno del dominio de unión al ligando del receptor de estrógeno (ER-LBD), que a su vez se fusiona con el dominio de activación de p65 de NF-κB (p65). Se proporciona un ejemplo de una secuencia de aminoácidos en la Tabla 10 y se identifica como la SEQ ID NO: 40. El dominio mutante de unión al ligando específico de tamoxifeno del dominio de unión al ligando del receptor de estrógeno (ER-LBD) se encuentra en los aminoácidos 282- 595 de TamR-tf y tiene una mutación en la posición 521. El dominio de activación de p65 de NF-κB (p65 o TAD) se encuentra en los aminoácidos 596 a 862.

En algunas alternativas, se proporciona un sistema para la expresión inducible de un receptor de antígeno quimérico, en el que el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el dominio de unión al ligando es específico para un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular; y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido al ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el fármaco es el tamoxifeno y/o sus metabolitos. En algunas alternativas, el segundo promotor es constitutivo o inducible. En algunas alternativas, el primer promotor comprende una secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 41. En algunas alternativas, el segundo promotor es un promotor constitutivo. En algunas alternativas, el segundo promotor es el EFlap. En algunas alternativas, el activador transcripcional comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 40. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además un primer vector y el segundo ácido nucleico comprende además un segundo vector. En algunas alternativas, ambos vectores se empaquetan en un vector viral. En algunas alternativas, el vector viral es un lentivirus. En algunas alternativas, el primer y segundo ácido nucleico comprenden un vector. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un marcador seleccionable. En algunas alternativas, el

segundo ácido nucleico comprende además un ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable. En algunas alternativas, se proporciona un sistema para la expresión inducible del receptor de antígeno quimérico, en el que el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco unido operativamente a un polinucleótido que codifica una citocina, un receptor de quimiocina, un polipéptido que regula la apoptosis, o un polipéptido que modula la señalización del punto de control; y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido al ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el polipéptido que modula la señalización del punto de control inhibe los reguladores de puntos de control negativos. En algunas alternativas, el regulador del punto de control negativo comprende VISTA, LAG-3 y/o TIM3. En algunas alternativas, el segundo promotor es constitutivo o inducible. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica el receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el dominio de unión al ligando es específico para un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el primer promotor está en orientación opuesta al segundo promotor. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento de anticuerpo, preferiblemente un fragmento de unión del mismo. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento variable de cadena sencilla. En algunas alternativas, la molécula específica del tumor es CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, CE7, EGFR, hB7H3, mesotelina, c-Met, PSMA, Her2, GD-2 o MAGE A3 TCR o combinaciones de las mismas. En algunas alternativas, el sistema emplea un activador transcripcional sintético que, en presencia de un fármaco, se une a un promotor sintético secuenciado arriba de un transgén para inducir la expresión. En algunas alternativas, el activador transcripcional es TamR-tf (HEA3). En algunas alternativas, el fármaco es tamoxifeno.

Se pueden realizar cambios adicionales en el activador transcripcional para aumentar las propiedades del factor de transcripción incluyendo, sin limitación, alterar uno o más aminoácidos en el dominio de unión al ligando del receptor de estrógeno y/o alterar uno o más aminoácidos en el dominio de transactivación de p65. La alteración de los aminoácidos en el dominio de unión al receptor de estrógeno puede proporcionar una unión más específica del fármaco al activador transcripcional. Un ejemplo de un activador transcripcional con secuencia de aminoácidos alterada en el ER-LBD se muestra en la Tabla 11 (SEQ ID NO: 43). Las mutaciones se realizan en la posición de aminoácidos 400, 543 y 544 de la SEQ ID NO: 40. El activador transcripcional con secuencia alterada tiene mayor afinidad por el tamoxifeno o 4-OHT. La alteración de los aminoácidos en el dominio transactivador de p65 puede proporcionar una expresión aumentada del transgén en ausencia de activación de las células transducidas.

En ausencia de tamoxifeno, TamR-tf se excluye del núcleo mediante la unión de la proteína de choque térmico citosólico 90 (HSP90) al sitio activo de unión de tamoxifeno y la expresión del transgén está en el estado "DESACTIVADO". Las concentraciones nanomolares de tamoxifeno citosólico superan activamente a HSP90 en la unión de ER-LBD, lo que resulta en la translocación de TamR-tf al núcleo. Tras la translocación nuclear, TamR-tf está fácilmente disponible para unirse a su promotor sintético restringido. En presencia de tamoxifeno, la unión de TamR-tf al promotor 7xHBD/EF1 α p induce el estado "ACTIVADO" de la expresión del transgén. En algunas alternativas, este regulador transcripcional puede modificarse para proporcionar un nivel variable de control de la expresión del transgén. Las sustituciones de aminoácidos en el LBD de TamR-tf (HEA-3) permiten una respuesta selectiva al tamoxifeno y sus metabolitos, en la que el 4-hidroxi tamoxifeno (4-OHT) es el metabolito más activo farmacológicamente, en lo que respecta a la actividad de TamR-tf (HEA-3), mientras que carece de interacción con el estrógeno endógeno.

En algunas alternativas, el promotor inducible funciona en un constructo lentiviral y/o en linfocitos.

Receptores de antígenos quiméricos

Un sistema para la expresión de un receptor de antígeno quimérico comprende: un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico, comprendiendo el receptor de antígeno quimérico un dominio de unión al ligando, en el que el dominio de unión al ligando es específico para un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; 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 de antígeno quimérico está bajo el control de un promotor constitutivo. En algunas alternativas, el fármaco es tamoxifeno.

Dominio de unión al ligando

En algunas alternativas, el ácido nucleico del receptor quimérico comprende un polinucleótido que codifica un dominio de unión al ligando. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando se une específicamente a un antígeno específico de tumor o viral y dicho dominio de unión al ligando se puede humanizar. En algunas alternativas, un dominio de unión al ligando incluye, sin limitación, receptores o porciones de los mismos, péptidos pequeños,

peptidomiméticos, sustratos, citocinas y similares. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un anticuerpo o fragmento del mismo, preferiblemente un fragmento de unión del mismo, cualquiera de los cuales puede ser humanizado. Se puede determinar fácilmente una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. En una alternativa específica, el polinucleótido codifica un Fv de cadena sencilla que se une específicamente a CD19. En otras alternativas específicas, el polinucleótido codifica un Fv de cadena sencilla que se une específicamente a HER2, CE7, hB7H3 o EGFR y, opcionalmente, dicho polinucleótido codifica una versión humanizada del mismo. Las secuencias de estos anticuerpos y los dominios de unión de los mismos son conocidas o pueden ser determinadas fácilmente por los expertos en la técnica.

Los antígenos tumorales son proteínas que son producidas por células tumorales que provocan una respuesta inmune. La selección del dominio de unión al ligando de la invención dependerá del tipo de cáncer a tratar y puede dirigirse a antígenos tumorales u otras moléculas de la superficie de las células tumorales. Una muestra de tumor de un sujeto se puede caracterizar 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 Her2Neu, receptor de estrógeno y/o receptor de progesterona. Se selecciona un antígeno tumoral o una molécula de superficie celular que se encuentra en las células tumorales del sujeto individual. Los antígenos tumorales y las moléculas de la superficie celular son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno prostático específico, PSMA, Her2/neu, receptor de estrógeno, receptor de progesterona, efrina B2, CD19, 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 la superficie celular que se encuentra en las células tumorales y no se encuentra sustancialmente en los tejidos normales, o restringida en su expresión a los tejidos normales no vitales.

En una alternativa, la molécula diana en el tumor comprende uno o más epítopos asociados con un tumor maligno. Los tumores malignos expresan una serie de proteínas que pueden servir como antígenos diana para el reconocimiento mediado por receptor de células T o receptor quimérico. Otras moléculas diana pertenecen al grupo de moléculas relacionadas con la transformación celular, tales como el oncogén HER-2/Neu/ErbB2. 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 de tejido. En otras alternativas, el antígeno tumoral es un polipéptido de la superficie celular.

Una vez que se identifica una molécula de la superficie de la célula tumoral que podría ser dirigida con un receptor quimérico, se selecciona y caracteriza un epítipo de la molécula diana. Los anticuerpos que se unen específicamente a una molécula de la superficie de la célula tumoral se pueden preparar usando métodos para obtener anticuerpos monoclonales, métodos de presentación en fagos, métodos para generar anticuerpos humanos o humanizados, o métodos que usan un animal o planta transgénicos modificados para producir anticuerpos humanos. Se encuentran disponibles bibliotecas de presentación en fagos de anticuerpos parcial o totalmente sintéticos y se pueden cribar en busca de un anticuerpo o fragmento del mismo que pueda unirse a la molécula diana. También están disponibles bibliotecas de presentación en fagos de anticuerpos humanos. En algunas alternativas, los anticuerpos se unen específicamente a una molécula de la superficie de la célula tumoral y no reaccionan de forma cruzada con componentes inespecíficos como la 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 puede aislarse y/o determinarse.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno incluyen todos o una parte 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, preferiblemente la región de unión al antígeno o variable del anticuerpo intacto y se pueden preparar fácilmente. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos de cadena sencilla; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. En algunas alternativas, los fragmentos de anticuerpo son fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos de cadena sencilla; o anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos mencionados anteriormente se pueden humanizar y usar con las composiciones y métodos descritos en el presente documento.

En algunas alternativas, se pueden aislar y caracterizar varios anticuerpos diferentes que se unen a moléculas de la superficie de una célula tumoral particular. En algunas alternativas, los anticuerpos se caracterizan basándose en la especificidad del epítipo de la molécula diana. Además, en algunos casos, los anticuerpos que se unen al mismo epítipo pueden seleccionarse basándose en la afinidad del anticuerpo por ese epítipo. En algunas alternativas, un anticuerpo tiene una afinidad de al menos 1 mM, y preferiblemente <50 nM. En algunas alternativas, el anticuerpo tiene una afinidad de 50 nM, 100 nM, 200 nM, 300 nM, 400 nM, 500 nM, 1 μM, 100 μM, 200 μM, 300 μM, 400 μM, 500 μM, 600 μM, 700 μM, 800 μM, 900 μM o 1 mM o una afinidad dentro de un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores mencionados anteriormente. En algunas alternativas, se selecciona un anticuerpo que tenga una mayor afinidad por el epítipo, en comparación con otros anticuerpos. Por ejemplo, se selecciona un anticuerpo que tenga al menos una afinidad 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 que la de un anticuerpo de referencia que se une al mismo epítipo o una afinidad

que es mayor que la de un anticuerpo de referencia dentro de un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores mencionados anteriormente.

En algunas alternativas, las moléculas diana son CD19, CD20, CD22, CD23, CE7, hB7H3, EGFR, CD123, CS-1, ROR1, mesotelina, Her2, c-Met, PSMA, GD-2 o MAGE A3 TCR o combinaciones de los mismos. En algunas alternativas, el anticuerpo o el fragmento de unión del mismo específico para estas moléculas diana se humaniza.

En alternativas específicas, el antígeno diana es CD19. Los expertos en la técnica conocen una serie de anticuerpos específicos para CD19 y pueden caracterizarse fácilmente por la secuencia, la unión del epítipo y la afinidad. En una alternativa específica, el constructo del receptor quimérico incluye una secuencia de scFV de un 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: 88), una secuencia de CDRL2 de SRLHSGV (SEQ ID NO: 89) y una secuencia CDRL3 de GNTLPYTTFG (SEQ ID NO: 90). 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: 91), la secuencia de CDRH2 de VIWGSETTYNSALKS (SEQ ID NO: 92) y una secuencia de CDRH3 de YAMDYWG (SEQ ID NO: 93). La divulgación también contempla regiones variables que tienen al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con la del scFv para FMC63 y que tengan al menos la misma afinidad por CD19.

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

En alternativas específicas, el antígeno diana es Her2. Los expertos en la técnica conocen una serie de anticuerpos específicos para Her2 y pueden caracterizarse fácilmente por la secuencia, la unión del epítipo y la afinidad. En una alternativa específica, el constructo del receptor quimérico incluye una secuencia scFV de un anticuerpo de Herceptina. En otras alternativas, el scFV es un scFv humano o humanizado que comprende una cadena ligera variable que comprende una secuencia de CDRL1, una secuencia de CDRL2 y una secuencia de CDRL3 del anticuerpo de Herceptina. En otras alternativas, el scFV es un scFv humano o humanizado que comprende una cadena pesada variable que comprende la secuencia de CDRH1, CDRH2 y una secuencia de CDRH3 de Herceptina. Las secuencias de CDR se pueden determinar fácilmente a partir de la secuencia de aminoácidos de Herceptina. La divulgación también contempla regiones variables que tienen al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con la del scFv para Herceptina y que tienen al menos la misma afinidad por Her2.

"Anticuerpos humanizados", como se describe en el presente documento, se refiere a anticuerpos de especies no humanas cuyas secuencias de proteínas se han modificado para aumentar su similitud con variantes de anticuerpos producidas naturalmente en humanos. El proceso de "humanización" se puede aplicar a anticuerpos monoclonales desarrollados para su administración a seres humanos (por ejemplo, anticuerpos desarrollados como fármacos contra el cáncer). La humanización puede ser deseable cuando el proceso de desarrollo de un anticuerpo específico implica la utilización de un sistema inmunológico no humano (como el de los ratones). Las secuencias de proteínas de los anticuerpos producidos de esta manera son parcialmente distintas de los anticuerpos homólogos que se encuentran de forma natural en los seres humanos y, por lo tanto, son potencialmente inmunogénicas cuando se administran a pacientes humanos. Los anticuerpos humanizados se diferencian de los anticuerpos quiméricos en que tienen secuencias de proteínas más similares a los anticuerpos humanos, pero pueden portar un tramo más grande de proteína no humana. Un derivado de un anticuerpo humanizado puede referirse a un segmento de un anticuerpo o secuencia que se deriva de un anticuerpo humanizado. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando comprende un anticuerpo humanizado o una parte del mismo. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando comprende un scFv. En algunas alternativas, el scFv es un scFv humanizado.

La humanización puede ser deseable en algunas alternativas para reducir la inmunogenicidad de anticuerpos monoclonales que se derivan de fuentes xenogénicas, tales como, por ejemplo, roedores. La humanización también es deseable en algunas alternativas para mejorar la interacción del anticuerpo o un fragmento del mismo con el sistema inmunológico humano. Debido al desarrollo de la tecnología de los hibridomas, una gran cantidad de anticuerpos xenogénicos son altamente inmunogénicos en humanos, lo que en última instancia puede limitar sus aplicaciones clínicas, especialmente cuando es posible que sea necesario repetir la administración. Además, pueden eliminarse rápidamente de la circulación y también pueden causar efectos inflamatorios sistémicos. Por lo tanto, las estrategias de humanización son deseables en algunas alternativas para sortear estas situaciones. Los expertos en la técnica conocen técnicas para la humanización de anticuerpos.

En algunas alternativas, un polinucleótido que codifica un dominio de unión al ligando está operativamente unido a un polinucleótido que codifica una región espaciadora. En algunas alternativas, el polinucleótido que codifica un dominio de unión al ligando 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 el reemplazo del polinucleótido con otro polinucleótido que codifica un

dominio de unión al ligando que codifica un antígeno diferente o que tiene diferentes características de unión. Por ejemplo, un sitio de restricción, NheI, está codificado secuencia arriba de la secuencia líder; y un RsrII 3' ubicado dentro de la región bisagra permite la subclonación de cualquier scFv deseable en un vector receptor quimérico. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene un codón optimizado para la expresión en células de mamífero.

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

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

En la Tabla 1 se muestra una alternativa específica de un polinucleótido que codifica un dominio de unión al ligando como el scFv de un anticuerpo que se une específicamente a CD19, tal como FMC63. Un polinucleótido que codifica un enlazador flexible que incluye los aminoácidos GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 94) separa las cadenas VH y VL en el scFv. La secuencia de aminoácidos del scFv que incluye el enlazador se muestra en la Tabla 2 (SEQ ID NO: 11). 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).

Espaciador

En algunas alternativas, el ácido nucleico del receptor quimérico comprende un polinucleótido que codifica una región espaciadora. Normalmente, se encuentra una región espaciadora entre el dominio de unión al ligando y el dominio transmembrana del receptor quimérico. En algunas alternativas, una región espaciadora proporciona flexibilidad al dominio de unión al ligando y permite altos niveles de expresión en linfocitos. Un receptor quimérico específico de CD19 que tiene un dominio espaciador de 229 aminoácidos tenía menos actividad antitumoral que un receptor quimérico específico de CD19 con una región espaciadora corta compuesta únicamente por la bisagra de IgG4 modificada. En algunas alternativas, el espaciador está optimizado para una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia.

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 dentro de un intervalo definido por dos de las longitudes mencionadas anteriormente. En algunas alternativas, una región espaciadora tiene 12 aminoácidos o menos, 119 aminoácidos o menos, o 229 aminoácidos o menos pero más de 1 o 2 aminoácidos. En algunas alternativas, el espaciador está optimizado para una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia.

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 parte de la región bisagra de una IgG1 humana, IgG2 humana, IgG3 humana o IgG4 humana, y puede contener una o más sustituciones de aminoácidos. En la Tabla 8 se proporcionan ejemplos de secuencias de las regiones bisagra. En algunas alternativas, una parte de la región bisagra incluye los aminoácidos superiores de la bisagra que se encuentran entre la cadena pesada variable y el núcleo, y los aminoácidos del núcleo de la bisagra que incluyen una región de poliprolina. En algunas alternativas, el espaciador está optimizado para una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia.

En algunas alternativas, las secuencias de la región bisagra se pueden modificar en uno o más aminoácidos para evitar interacciones estructurales indeseables tales como la 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 2 o la Tabla 8 (SEQ ID NO: 21). En la Tabla 1 se proporciona un representante de un polinucleótido que codifica una parte de una región bisagra de IgG4 modificada (SEQ ID NO: 4). En algunas alternativas, una región bisagra puede tener al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de la región bisagra identificada en la Tabla 2 o Tabla 8, o cualquier otro porcentaje de identidad de secuencia entre dos cualesquiera de las identidades de secuencia porcentuales enumeradas. En una alternativa específica, una porción de una región bisagra humana de IgG4 tiene una sustitución de aminoácidos en los aminoácidos centrales de CPSP a CPPC.

En algunas alternativas, toda o una parte de la región bisagra se combina con uno o más dominios de una región constante de una inmunoglobulina. Por ejemplo, una parte de una región bisagra se puede combinar con todo o una parte de un dominio de CH2 o CH3 o una variante del mismo. En algunas alternativas, la región espaciadora no incluye la secuencia de la región bisagra de 47-48 aminoácidos de CD8 alfa o la región espaciadora que consiste en una porción extracelular de la molécula CD28.

En algunas alternativas, una región espaciadora corta tiene 12 aminoácidos o menos y comprende toda o una porción de una secuencia de la región bisagra de IgG4 o una variante de la misma, una región espaciadora intermedia tiene 119 aminoácidos o menos y comprende todo o una porción de una secuencia de la región bisagra de IgG4 y una región CH3 o variante de la misma, y un espaciador largo tiene 229 aminoácidos o menos y comprende toda o una porción de una secuencia de la región bisagra de IgG4, una región CH2 y una región CH3 o variante de la misma. 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 dos cualesquiera de las longitudes de aminoácidos antes mencionadas. 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 dos cualesquiera de las longitudes de aminoácidos antes mencionadas. 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 dos cualesquiera de las longitudes de aminoácidos mencionadas anteriormente.

Se puede preparar fácilmente un polinucleótido que codifica una región espaciadora mediante métodos sintéticos o recombinantes a partir de la secuencia de aminoácidos. En algunas alternativas, un polinucleótido que codifica una región espaciadora está operativamente unida 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 facilitar la escisión y el reemplazo del polinucleótido con otro polinucleótido codificante para una región espaciadora diferente. En algunas alternativas, el polinucleótido que codifica la región espaciadora tiene un codón optimizado para la expresión en células de mamífero.

Como alternativa, la región espaciadora es una secuencia de la región bisagra de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 o una parte de la misma, una secuencia de la región bisagra de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 en combinación con todo o una parte de una región CH2 o una variante de la misma, una secuencia de la región bisagra de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 en combinación con toda o una parte de una región CH3 o una variante de la misma, y/o 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: 4) que tiene 12 aminoácidos o menos pero más de uno o dos aminoácidos, una secuencia intermedia es una secuencia de bisagra de IgG4 con una secuencia de CH3 que tiene 119 aminoácidos o menos pero más de uno o dos aminoácidos (SEQ ID NO: 62); o una secuencia de bisagra de IgG4 con una región CH2 y CH3 que tiene 229 aminoácidos o menos pero más de uno o dos aminoácidos (SEQ ID NO: 50).

Dominio transmembrana

En algunas alternativas, el ácido nucleico del receptor quimérico comprende un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana. El dominio transmembrana proporciona el anclaje del receptor quimérico en la membrana.

Como alternativa, se usa el dominio transmembrana que está naturalmente asociado con uno de los dominios en el receptor quimérico. En algunos casos, el dominio transmembrana puede seleccionarse o modificarse mediante sustitución de aminoácidos para evitar la unión de dichos dominios a los dominios transmembrana de las mismas proteínas de membrana de superficie o diferentes para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor.

El dominio transmembrana puede derivarse de una fuente natural o sintética. Cuando la fuente es natural, el dominio puede derivarse de cualquier proteína transmembrana o unida a la membrana.

Las regiones transmembrana comprenden al menos la región o regiones transmembrana de la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células 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 CD28 como se muestra en la Tabla 2. Una secuencia polinucleotídica representativa que codifica el dominio transmembrana de CD28 se muestra en la Tabla 1 (SEQ ID NO: 5).

Un dominio transmembrana puede ser sintético o una variante de un dominio transmembrana natural. En algunas alternativas, los dominios transmembrana sintéticos o variantes comprenden predominantemente residuos hidrófobos tales como leucina y valina. En algunas alternativas, un dominio transmembrana puede tener al menos 80%, 85%, 90%, 95% o 100% de identidad de secuencia de aminoácidos con un dominio transmembrana como se muestra en la Tabla 2 o Tabla 6 o una identidad de secuencia de aminoácidos dentro de un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores mencionados anteriormente. Los dominios transmembrana variantes tienen preferiblemente una puntuación hidrófoba de al menos 50 como la calculada por Kyte Doolittle.

Se puede preparar fácilmente un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana mediante métodos sintéticos o recombinantes. En algunas alternativas, un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana está operativamente unido 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 facilitar la escisión y el reemplazo 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 tiene un codón optimizado para la expresión en células de mamífero. En algunas alternativas, las células de mamíferos son células humanas.

Dominio de señalización intracelular

En algunas alternativas, el ácido nucleico del receptor quimérico comprende un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular. El dominio de señalización intracelular proporciona la activación de una función de la célula transducida que expresa el receptor quimérico tras la unión al ligando expresado en las 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 parte y/o una variante de un dominio de señalización intracelular que proporciona la activación de al menos una función de la célula transducida.

Los ejemplos de dominios de señalización intracelular para su uso en un receptor quimérico de la divulgación incluyen las secuencias citoplasmáticas de la cadena zeta de CD3 y/o correceptores que actúan en concierto para iniciar la transducción de señales después del acoplamiento del receptor quimérico, así como cualquier derivado o variante de estas secuencias y cualquier secuencia sintética que tenga la misma capacidad funcional. Se puede decir que la activación de las células 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 las células T (secuencias de señalización citoplasmáticas primarias) y las que actúan de manera independiente del antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora (secuencias de señalización citoplasmáticas secundarias). Las secuencias de señalización citoplasmáticas primarias que actúan de forma estimulante pueden contener motivos de señalización que se conocen como motivos de activación basados en el receptor tirosina o ITAM. Los ejemplos de ITAM que contienen secuencias de señalización citoplasmáticas 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 80%, 85%, 90% o 95% de identidad de secuencia con CD3 zeta que tiene una secuencia proporcionada en la Tabla 2 o al menos un porcentaje de identidad de secuencia que está dentro de un intervalo definido por dos de las identidades de secuencia porcentuales enumeradas. En algunas alternativas de las variantes CD3 zeta conservan al menos una, dos, tres o todas las regiones ITAM como se muestra en la Tabla 7.

En una alternativa preferida, el dominio de señalización intracelular del receptor quimérico puede diseñarse para que comprenda el dominio de señalización de CD3 zeta por sí mismo o combinado con cualquier otro dominio o dominios citoplasmáticos deseados. Por ejemplo, el dominio de señalización intracelular del receptor quimérico puede comprender una cadena CD3 zeta 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 la superficie celular distinta de un receptor de antígeno o sus ligandos que se requiere para una respuesta de los linfocitos a un antígeno. Ejemplos de tales moléculas incluyen CD27, CD28, 4-1BB (CD 137), OX40, CD30, CD40, antígeno 1 asociado a la función de linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, cadena zeta asociada a proteína quinasa (ZAP70), y/o un ligando que se une específicamente con CD83. En algunas alternativas, el dominio de señalización coestimulador puede tener al menos 80%, 85%, 90% o 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con el dominio intracelular de CD28 como se muestra en la Tabla 5 o con 4-1BB que tiene una secuencia proporcionada en la Tabla 2 o al menos un porcentaje de identidad de secuencia que está dentro de un intervalo definido por dos cualesquiera de las identidades de secuencia porcentuales enumeradas. Como alternativa, una variante del dominio intracelular de CD28 comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones 186-187, en las que LL está sustituido con GG.

Las secuencias de señalización intracelular del receptor quimérico se pueden unir entre sí en un orden aleatorio o especificado. En algunas alternativas, un enlazador oligo o polipéptido corto, preferiblemente de entre 2 y 10 aminoácidos de longitud, puede formar el enlace. En una alternativa, los dominios de señalización intracelular comprenden todo o una parte del dominio de señalización de CD3 zeta o una variante del mismo y todo o una parte del dominio de señalización de CD28 o una variante del mismo. En otra alternativa, el dominio de señalización intracelular comprende todo o una parte del dominio de señalización de CD3 zeta o una variante del mismo y todo o una parte del dominio de señalización de 4-1BB o una variante del mismo. En otra alternativa más, el dominio de señalización intracelular comprende todo o una parte del dominio de señalización de CD3 zeta o una variante del mismo, todo o una parte del dominio de señalización de CD28 o una variante del mismo, y todo o una parte del dominio de señalización de 4-1BB o una variante del mismo. En una alternativa específica, la secuencia de aminoácidos del dominio de señalización intracelular que comprende una variante de CD3 zeta y una porción del dominio de señalización intracelular de 4-1BB se proporciona en la Tabla 2. Una secuencia de ácidos nucleicos representativa se proporciona en la Tabla 1 (SEQ ID NO : 6; SEQ ID NO: 7). En algunas alternativas, la secuencia de ácidos nucleicos comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 6. En algunas alternativas, la secuencia de ácidos nucleicos comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 7.

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 de CD3 zeta. En otras alternativas, un dominio intracelular de 4-1BB y un dominio intracelular de CD28 están unidos a una porción de un dominio de CD3 zeta.

Se puede preparar fácilmente un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular mediante métodos sintéticos o recombinantes a partir 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 facilitar la escisión y el reemplazo 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 tiene un codón optimizado para la expresión en células de mamífero. En algunas alternativas, las células de mamíferos son células humanas.

Secuencias de marcadores

En algunas alternativas, el sistema comprende además una o más secuencias marcadoras bajo el control de un promotor inducible. Una secuencia marcadora puede proporcionar la selección de células transducidas y/o la identificación de células transducidas. En algunas alternativas, la secuencia marcadora es para una selección de células transducidas y/o identificación de células transducidas. En algunas alternativas, la secuencia marcadora está operativamente unida a una secuencia polinucleotídica que codifica una secuencia enlazadora. En algunas alternativas, la secuencia enlazadora es una secuencia enlazadora escindible. En algunas alternativas, el enlazador es un enlazador T2A escindible.

Se pueden emplear varias secuencias de marcadores diferentes. Normalmente, una secuencia marcadora tiene una característica funcional que permite la selección de células transducidas y/o la detección de células transducidas. En algunas alternativas, la secuencia marcadora es compatible con la transducción de linfocitos humanos. En algunas alternativas, la secuencia marcadora permite la selección de células transducidas y/o la detección de células transducidas.

El marcador seleccionable positivo puede ser un gen, que al ser introducido en la célula huésped, expresa un fenotipo dominante que permite la selección positiva de células portadoras del gen. Los genes de este tipo son conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, el gen de la higromicina-B fosfotransferasa (hph) que confiere resistencia a la higromicina B, el gen de la aminoglucósido fosfotransferasa (neo o aph) de Tn5, que codifica la resistencia al antibiótico G418, el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR), que proporciona resistencia al metotrexato, DHFR dm (ejemplos de secuencias de polinucleótidos y aminoácidos en la Tabla 14, SEQ ID NO: 46 y SEQ ID NO: 47, el gen pac que proporciona resistencia a la puromicina, 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 serán seleccionadas.

Como alternativa, un primer ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica una secuencia marcadora. Como alternativa, la secuencia marcadora es un receptor del factor de crecimiento epidérmico truncado como se muestra en la Tabla 2. En la Tabla 1 se muestra un ejemplo de polinucleótido para el receptor del factor de crecimiento epidérmico truncado (SEQ ID NO: 9). En algunas alternativas, la secuencia marcadora es una secuencia Her2 truncada. Un ejemplo de un polinucleótido y un aminoácido para las secuencias de Her2 truncadas se muestran en la Tabla 13 y se proporcionan por la SEQ ID NO: 44 y la SEQ ID NO: 45, respectivamente.

En algunas alternativas, el polinucleótido que codifica la secuencia marcadora está operativamente unido a un polinucleótido que codifica una secuencia enlazadora. En una alternativa específica, la secuencia enlazadora es una secuencia enlazadora escindible T2A, como se muestra en la Tabla 2. En la Tabla 1 se proporciona un ejemplo de una secuencia polinucleotídica que codifica el enlazador T2A (SEQ ID NO: 8).

Se puede preparar fácilmente un polinucleótido que codifica la secuencia marcadora mediante métodos sintéticos o recombinantes a partir de la secuencia de aminoácidos. En algunas alternativas, un polinucleótido que codifica una secuencia marcadora está operativamente unido a un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el polinucleótido que codifica una secuencia marcadora 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 el reemplazo del polinucleótido que codifica una secuencia marcadora con otro polinucleótido que codifica una secuencia marcadora diferente. En algunas alternativas, el polinucleótido que codifica una secuencia marcadora tiene un codón optimizado para la expresión en células de mamíferos, preferiblemente humanos.

En algunas alternativas, se pueden emplear dos o más secuencias marcadoras. En algunas alternativas, una primera secuencia marcadora está bajo el control de un promotor constitutivo y proporciona una indicación de que la célula transducida está expresando el transgén. En otras alternativas, una segunda secuencia marcadora está bajo el control del promotor inducible y proporciona una indicación de que se ha inducido la expresión del transgén. En algunas alternativas, el marcador bajo el control del promotor inducible puede usarse para seleccionar células en las que la expresión no inducida o basal es mucho menor que en otras células seleccionando células que tienen una expresión más baja de la secuencia marcadora bajo el control del promotor inducible y expanda esas células para otras aplicaciones.

Otros componentes genéticos bajo el control del promotor inducible

En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica genes que promueven la supervivencia y la proliferación, genes que previenen la apoptosis y/o genes que inhiben la señalización del punto de control negativo bajo el control de un promotor inducible. Dichos genes incluyen genes que codifican quimeras de IL-2, IL-15, receptores de quimiocinas, Bcl2, CA-Akt, dn-TGFbetaRIII, dn-SHP1/2 y/o PD-1CD28. Estos genes también se colocan bajo el control de un promotor inducible como se describe en este documento. En algunas alternativas, los genes codifican quimeras de IL-2, IL-15, receptores de quimiocinas, Bcl2, CA-Akt, dn-TGFbetaRIII, dn-SHP1/2 y/o PD-1CD28. En algunas alternativas, el gen que modula la señalización del punto de control codifica un polipéptido que inhibe los reguladores del punto de control negativo. En algunas alternativas, el regulador del punto de control negativo comprende VISTA, LAG-3 y/o TIM3.

En algunas alternativas, un primer ácido nucleico comprende un primer promotor inducible unido a un polinucleótido que codifica un receptor de citocina o quimiocina. Las quimiocinas, también denominadas citocinas quimiotácticas, son un grupo de proteínas relacionadas estructuralmente que regulan el tráfico celular de linfocitos. En algunas alternativas, las quimiocinas son homeostáticas o inflamatorias. Los receptores de quimiocinas incluyen CCR2, CCR7 o CCR15. Las citocinas incluyen interleucinas tales como IL2, IL-12, IL-7 y/o 11-15, interferones tales como el interferón δ , factor de necrosis tumoral y un agonista de TLR4. En algunas alternativas, los receptores de quimiocinas comprenden CCR2, CCR7 y/o CCR15. En algunas alternativas, los receptores de quimiocinas incluyen CCR2, CCR7 o CCR15. En algunas alternativas, las citocinas incluyen interleucinas, en las que las interleucinas son IL-2, IL-12, IL-7 y/o 11-15 o interferones, en las que los interferones comprenden interferón δ , factor de necrosis tumoral o un agonista de TLR4.

En algunas alternativas, un primer ácido nucleico comprende un primer promotor inducible unido a un polinucleótido que codifica un polipéptido que regula la apoptosis. En algunas alternativas, los genes que inhiben la apoptosis incluyen, por ejemplo, Bcl2 y/o CA-Akt. En algunas alternativas, el polipéptido es Bcl2 o CA-Akt.

En algunas alternativas, un primer ácido nucleico comprende un primer promotor inducible unido a un polinucleótido que codifica un polipéptido que modula la señalización del punto de control. Dichos genes incluyen quimeras de dn-TGFbetaRIII, dn-SHP1/2 y/o PD-1CD28. En algunas alternativas, el polipéptido son quimeras de dn-TGFbetaRIII, dn-SHP1/2 y/o PD-1CD28. En algunas alternativas, el polipéptido que modula la señalización del punto de control inhibe los reguladores del punto de control negativos. En algunas alternativas, el regulador del punto de control negativo comprende VISTA, LAG-3 y/o TIM3.

Los ejemplos de secuencias de polinucleótidos que codifican estos genes se encuentran en:

Gen	A.A.	A.A.	N.A.	N.A.
	Acceso	gl	Acceso	gl
CCR2	P41597	1168965	NM_001123041	183979979
CCR7	P32248	1352335	NM_001838	299473754
IL-2	AAH70338	47682793	BC070338	47682792
IL-12	AAD16432	4323579	AF101062	4323578
IL-7	AAC63047	386824	NM_000880	315467865
IL-15	CAG46804	49456967	CR542007	49456966
IFN-g	EAU97180	119617586	EAU97180	119617586
TNF	NP_000585	25952111	NM_000594	395132451
Bcl2	AAH27258	20072668	BC027258	20072667
CA-Akt	NP_001014432	62241015	NM_001014432	62241014
Receptor III de TGFbeta	Q03167	311033535	NM_003243	307574689
SHP1	NP_002822	18104989	NM_002831	166064064
SHP2	Q06124	84028248	NM_002834	33356176
PD-1	NP_001129245	209413749	NM_001135773	209413748
CD28	AAA51945	180092	NM_006139	340545506

Se puede colocar cualquier número de ácidos nucleicos bajo el control de un promotor inducible, incluidos los que codifican el receptor de antígeno quimérico, secuencias marcadoras, una citocina, una quimiocina, un inhibidor de la apoptosis y/o un inhibidor de la señalización de punto de control negativo. En algunas alternativas, se pueden utilizar uno o más promotores inducibles para proporcionar un nivel de expresión adecuado de cada uno de los ácidos nucleicos. En algunas alternativas, los constructos se pueden preparar con un gen tal como una citocina bajo el control de un promotor inducible y un constructo que comprende un receptor de antígeno quimérico bajo el control de un promotor constitutivo. Tales constructos son útiles para proporcionar la supervivencia celular y la proliferación de células transducidas, por ejemplo, linfocitos que expresan un receptor de antígeno quimérico.

Sistemas promotores constitutivos

En otras alternativas, un sistema comprende un segundo ácido nucleico que comprende un promotor constitutivo o un segundo promotor inducible unido a un activador transcripcional. En otras alternativas, un sistema comprende un

segundo ácido nucleico que comprende un promotor unido a un activador transcripcional. En algunas alternativas, el promotor es un promotor constitutivo o un promotor inducible. En algunas alternativas, un promotor constitutivo incluye el promotor de EF1 α , el promotor de actina, el promotor de miosina, el promotor de hemoglobina y el promotor de creatina quinasa. En algunas alternativas, se excluyen los promotores virales tales como el promotor del CMV. En algunas alternativas, el promotor constitutivo se puede unir a uno o más de un polinucleótido que codifica el marcador, o un receptor de antígeno quimérico como se describe en el presente documento.

Promotores constitutivos

Un promotor constitutivo proporciona la expresión génica continua del gen bajo el control del promotor. En algunas alternativas, el promotor constitutivo es un promotor que proporciona la expresión génica en un constructo lentiviral y/o en linfocitos. En algunas alternativas, el promotor no se deriva de una fuente xenogénica tal como una planta o un virus.

En una alternativa específica, el promotor constitutivo comprende el promotor de EF1 α , el promotor de actina, el promotor de miosina, el promotor de hemoglobina y/o el promotor de creatina quinasa. En algunas alternativas, se excluyen los promotores virales tales como el promotor del CMV.

Activadores transcripcionales

En algunas alternativas, el promotor constitutivo está operativamente unido a un activador transcripcional. En algunas alternativas, el activador transcripcional activa un promotor inducible en presencia del inductor (por ejemplo, fármaco).

En algunas alternativas, se induce un promotor inducible en presencia de un activador transcripcional. En algunas alternativas, el activador transcripcional se une preferentemente al promotor en presencia del fármaco. En algunas alternativas, el activador transcripcional es TamR-tf (HEA3). La modificación del activador transcripcional puede realizarse en la secuencia de aminoácidos que puede afectar la capacidad del activador para unirse al fármaco, el promotor o ambos. Por ejemplo, la unión en el dominio de unión al ligando de ER afectaría la unión del fármaco al activador transcripcional.

En algunas alternativas, el sistema emplea un activador transcripcional sintético que, en presencia del fármaco (por ejemplo, tamoxifeno), se une a un promotor sintético secuencia arriba de un transgén para inducir la expresión. En algunas alternativas, el activador transcripcional es TamR-tf (HEA3). El factor de transcripción regulado por tamoxifeno ("TamR-tf", también denominado "HEA3") es un factor de transcripción quimérico compuesto de subunidades humanas, incluido el dominio de unión al ADN del extremo terminal N del factor nuclear de hepatocitos 1-alfa (HNF-1 α) (por ejemplo, los aminoácidos 1-281 de la SEQ ID NO: 40) fusionado en marco al dominio mutante de unión al ligando específico de tamoxifeno del dominio de unión al ligando del receptor de estrógeno (ER-LBD), que a su vez se fusiona con el dominio de activación de p65 de NF- κ B (p65). Se proporciona un ejemplo de una secuencia de aminoácidos en la Tabla 10 y se identifica como la SEQ ID NO: 40. El dominio mutante de unión al ligando específico de tamoxifeno del dominio de unión al ligando del receptor de estrógeno (ER-LBD) se encuentra en los aminoácidos 282- 595 de TamR-tf y tiene una mutación en la posición 521. El dominio de activación de p65 de NF- κ B (p65 o TAD) se encuentra en los aminoácidos 596 a 862.

Se pueden realizar cambios adicionales en el activador transcripcional para aumentar las propiedades del factor de transcripción incluyendo, sin limitación, alterar uno o más aminoácidos en el dominio de unión al ligando del receptor de estrógeno y/o alterar uno o más aminoácidos en el dominio transactivador de p65. La alteración de los aminoácidos en el dominio de unión al receptor de estrógeno puede proporcionar una unión más específica del fármaco al activador transcripcional. Un ejemplo de un activador transcripcional con secuencia alterada en el ER-LBD se muestra en la Tabla 11 (SEQ ID NO: 43). Las mutaciones se realizan en la posición de aminoácidos 400, 543 y 544 de la SEQ ID NO: 40. El activador transcripcional con secuencia alterada tiene mayor afinidad por el tamoxifeno o 4-OHT. La alteración de los aminoácidos en el dominio transactivador de p65 puede proporcionar una expresión aumentada del transgén en ausencia de activación de las células transducidas.

Marcador

En algunas alternativas, el promotor constitutivo está operativamente unido a un polinucleótido que codifica un polipéptido marcador. Dichos polipéptidos marcadores se describen en el presente documento e incluyen EGFRt, Her2t y/o DHFRdm.

Receptor de antígeno quimérico

En algunas alternativas, el promotor constitutivo está operativamente unido a un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico. En algunas alternativas, el receptor de antígeno quimérico comprende un dominio de unión al ligando, en el que el dominio de unión al ligando es específico para un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido

que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el espaciador está optimizado para proporcionar una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia. Se describen ejemplos de receptores de antígenos quiméricos en el presente documento.

Vectores

Puede construirse una variedad de combinaciones de vectores para proporcionar eficiencia de transducción y expresión transgénica. En algunas alternativas, el vector es un vector viral de paquete 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 algunas alternativas, el vector es un vector lentiviral. En algunas alternativas, el vector es un vector viral espumoso, vectores adenovirales, vectores retrovirales o vectores lentivirales.

En algunas alternativas, un vector plasmídico o un vector viral comprende un primer ácido nucleico que comprende un promotor inducible unido a un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico. En algunas alternativas, un vector plasmídico o vector viral comprende una primera secuencia de ácidos nucleicos que comprende un polinucleótido que codifica un gen que mejora la supervivencia o proliferación celular, un gen que regula la apoptosis y/o un gen que modula la señalización del punto de control. En algunas alternativas, la modulación de la señalización del punto de control inhibe los reguladores de puntos de control negativos. En algunas alternativas, el regulador de punto de control negativo comprende VISTA, LAG-3 y/o TIM3. Dichos polinucleótidos codifican una citocina o un receptor de quimiocina. En algunas alternativas, un vector plasmídico o un vector viral comprende un primer ácido nucleico que comprende un promotor inducible unido a un polinucleótido que codifica una secuencia marcadora. Las secuencias de marcadores se describen en el presente documento. En algunas alternativas, la secuencia marcadora es compatible con la transducción de linfocitos humanos. En algunas alternativas, la secuencia marcadora permite la selección de células transducidas y/o la detección de células transducidas. En algunas alternativas, el marcador es un gen que puede incluir, entre otros, el gen de la higromicina-B fosfotransferasa (hph), que confiere resistencia a la higromicina B, el gen de la aminoglucósido fosfotransferasa (neo o aph) de Tn5, que codifica la resistencia al antibiótico G418, el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR), que proporciona resistencia al metotrexato, DHFR dm (ejemplos de secuencias de polinucleótidos y aminoácidos en la Tabla 14, SEQ ID NO: 46 y SEQ ID NO: 47), el gen pac que proporciona resistencia a la puromicina, el gen Sh ble, que inactiva la zeocina, el gen de la adenosina desaminasa (ADA) y/o el gen de resistencia a múltiples fármacos (MDR). Un primer ácido nucleico puede incluir varias secuencias de polinucleótidos diferentes, todas bajo el control del promotor inducible. Por ejemplo, un polinucleótido que codifica un receptor antigénico quimérico puede unirse a un polinucleótido que codifica un polipéptido marcador y/o un polinucleótido que codifica un receptor de citocina o quimiocina.

En algunas alternativas, un vector lentiviral comprende un segundo ácido nucleico que comprende un promotor constitutivo unido a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el activador transcripcional que se une al fármaco y activa la expresión de un promotor inducible. En algunas alternativas, un vector lentiviral con un promotor constitutivo también puede incluir una secuencia de ácidos nucleicos que incluye un gen marcador, transposasa PiggyBac y/o un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico. Cada elemento del ácido nucleico se puede separar entre sí con una secuencia tal como una secuencia de autoescisión de T2A. En algunas alternativas, los elementos del ácido nucleico se separan entre sí con una secuencia de secuencia autoescindible. En algunas alternativas, la secuencia de autoescisión es T2A.

En otras alternativas, la secuencia de ácidos nucleicos heterogénea (heterogénea al 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 al vector viral. En algunas alternativas, el constructo contiene no más de 4 genes heterogéneos al vector viral. El número de genes heterogéneos al vector viral que se pueden empaquetar en el vector se puede determinar detectando la expresión de uno o más transgenes y seleccionando constructos de vector que proporcionen la transducción de al menos el 10% de las células y/o niveles de expresión detectable del transgén en al menos el 10% de las células.

En algunas alternativas, un lentivirus es un virus empaquetado dual. Un virus empaquetado dual contiene al menos un constructo condicional que comprende un promotor inducible unido operativamente a un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico. Opcionalmente, el constructo condicional comprende un gen marcador, un ácido nucleico para una citocina, un ácido nucleico para un receptor de quimiocina. En algunas alternativas, un lentivirus empaquetado dual contiene un constructo constitutiva que comprende un promotor constitutivo. Como alternativa, el constructo constitutivo comprende un promotor constitutivo unido a un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el constructo constitutivo también incluye un gen marcador y/o un polinucleótido que codifica una citocina o quimiocina. 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 la transducción en una población de células.

Quando los constructos constitutivos y condicionales contienen ambos un gen marcador, el gen marcador en cada constructo es el mismo o diferente entre sí. En algunas alternativas, cuando los constructos constitutivo y condicional contienen un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico, el receptor de antígeno quimérico puede dirigirse al mismo antígeno pero tener diferentes dominios de unión al ligando, puede dirigirse al mismo antígeno pero diferentes epítomos, o puede dirigirse a diferentes antígenos.

En algunas alternativas, el vector es un minicírculo. Los minicírculos son vectores de ADN episomal que se producen como casetes de expresión circular desprovistos de cualquier cadena principal de ADN plasmídico bacteriano. Su tamaño molecular más pequeño permite transfecciones más eficientes y ofrece una expresión sostenida durante un período de semanas en comparación con los vectores plasmídicos estándar que solo funcionan durante unos pocos días. En algunas alternativas, un minicírculo contiene un promotor inducible por fármacos unido a un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico. En algunas alternativas, el promotor inducible puede unirse a un receptor de quimiocina, un gen marcador y/o una citocina. Pueden emplearse uno o más minicírculos. En algunas alternativas, un minicírculo comprende un promotor inducible unido a un polinucleótido que codifica un primer receptor de antígeno quimérico, otro minicírculo comprende un promotor inducible unido a un polinucleótido que codifica un segundo y diferente receptor de antígeno quimérico, y/o un minicírculo comprende un promotor inducible unido a un unido a un polinucleótido que codifica un receptor de quimiocina, un receptor de antígeno quimérico y un gen marcador. Cada elemento de los constructos está separado por un ácido nucleico, como el que codifica una secuencia de T2A autoescindible. En algunas alternativas, cada elemento de los constructos está separado por un ácido nucleico, como el que codifica una secuencia de T2A autoescindible. En algunas alternativas, cada minicírculo difiere entre sí en el receptor de antígeno quimérico que incluye, entre otros, la longitud y secuencia del espaciador, el dominio de señalización intracelular y/o la secuencia marcadora. El vector de minicírculo se puede usar con un vector de lentivirus constitutivo que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el vector de minicírculo se usa con un vector de lentivirus constitutivo que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible.

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 las secuencias de repetición terminal invertida (ITR) específicas del transposón ubicadas en ambos extremos del vector del transposón y mueve de manera eficiente el contenido de los sitios originales y los integra de manera eficiente en los sitios cromosómicos TTAA. La potente actividad del sistema de transposones PiggyBac permite que los genes de interés entre los dos ITR en el vector PB se movilicen fácilmente en los genomas diana.

En algunas alternativas, un PB contiene un promotor inducible por fármaco unido a un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico. En algunas alternativas, el promotor inducible puede unirse a un receptor de quimiocina, un gen marcador y/o una citocina. Se pueden emplear uno o más transposones PB. En algunas alternativas, un PB comprende un promotor inducible unido a un polinucleótido que codifica un primer receptor de antígeno quimérico, otro PB comprende un promotor inducible unido a un polinucleótido que codifica un segundo y diferente receptor de antígeno quimérico, y/o un PB comprende un promotor inducible unido a un polinucleótido que codifica un receptor de quimiocina, un receptor de antígeno quimérico y un gen marcador. 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 entre sí en el receptor de antígeno quimérico que incluye, pero no se limita a, la longitud y secuencia del espaciador, el dominio de señalización intracelular y/o la secuencia marcadora. El vector PB puede usarse con un vector de lentivirus constitutivo que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible y el vector constitutivo que comprende la transposasa PiggyBac unida a un promotor constitutivo.

En algunas alternativas, un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el dominio de unión al ligando es específico para un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular; y un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor constitutivo o inducible unido operativamente al ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el primer y segundo ácido nucleico están en un solo vector de lentivirus. En algunas alternativas, el espaciador está optimizado para una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia.

En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además un gen marcador. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica un segundo y diferente receptor de antígeno quimérico. El primer y segundo receptor de antígeno quimérico pueden diferir entre sí en el dominio de unión al 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, en un único constructo de lentivirus, el primer y segundo ácidos nucleicos pueden separarse mediante un ácido nucleico aislante genómico tal como el dominio de cromatina aislante de erizo de mar. En otras alternativas, el promotor inducible del primer ácido nucleico y el promotor constitutivo del segundo ácido nucleico están en orientación opuesta.

Se pueden usar uno o más de estos vectores junto con otros para transducir células diana y proporcionar la expresión inducible de un receptor de antígeno quimérico.

Células huésped y composiciones: poblaciones de linfocitos T

Las composiciones descritas en el presente documento proporcionan células huésped modificadas genéticamente con los vectores y/o construcciones como se describe en el presente documento. En algunas alternativas, las células huésped son linfocitos T CD4+ y/o CD8+.

Los linfocitos T pueden recolectarse de acuerdo con técnicas conocidas y enriquecerse o agotarse 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 agotamiento, la expansión *in vitro* de los linfocitos T deseados se puede llevar a cabo de acuerdo con técnicas conocidas o variaciones de las mismas que serán evidentes para los expertos en la técnica. En algunas alternativas, las células T son células T autólogas obtenidas del paciente.

Por ejemplo, la población o subpoblación de células T deseada se puede expandir agregando una población de linfocitos T inicial a un medio de cultivo *in vitro* y luego agregando al medio de cultivo células alimentadoras, tales como células mononucleares de sangre periférica que no se dividen (PBMC), (por ejemplo, de manera que la población de células resultante contenga al menos 5, 10, 20 o 40 o más células alimentadoras PBMC para cada linfocito T en la población inicial que se va a expandir); e incubar el cultivo (por ejemplo, durante un tiempo suficiente para expandir el número de células 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 dos puntos finales de cualquiera de los valores enumerados para evitar la división celular. El orden de adición de las células T y las células alimentadoras al medio de cultivo se puede invertir si se desea. El cultivo se puede incubar típicamente 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 será generalmente al menos 25 grados Celsius, preferiblemente al menos 30 grados, más preferiblemente 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 dos puntos finales de cualquiera de los valores enumerados.

Los linfocitos T expandidos incluyen linfocitos T citotóxicos CD8+ (CTL) y linfocitos T colaboradores CD4+ que pueden ser específicos para un antígeno presente en un tumor humano o un patógeno. En algunas alternativas, las células incluyen células T precursoras. En algunas alternativas, las células son células madre hematopoyéticas.

En algunas alternativas, el método de expansión puede comprender además la adición de células linfoblastoides transformadas con EBV (LCL) que no se dividen como células alimentadoras. Las LCL se pueden irradiar con rayos gamma en el intervalo de 6.000 a 10.000 rads. En algunas alternativas, las LCL se irradian con rayos gamma de 6.000, 6.500, 7.000, 7.500, 8.000, 8.500, 9.000, 9.500 o 10.000 rads o cualquier cantidad de rads entre dos puntos finales de cualquiera de los valores enumerados. Las células alimentadoras LCL se pueden proporcionar en cualquier cantidad adecuada, tal como una proporción de células alimentadoras LCL a linfocitos T iniciales de al menos 10:1.

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

Después del aislamiento de los linfocitos T, tanto los linfocitos T citotóxicos como los colaboradores pueden clasificarse en subpoblaciones de células T no modificadas, de memoria y efectoras antes o después de la expansión.

Las células CD8+ se pueden obtener usando métodos estándar. En algunas alternativas, las células CD8+ se clasifican aún más en células no modificadas, de memoria central y de memoria efectora mediante la identificación de los antígenos de la superficie celular que están asociados con cada uno de esos tipos de células CD8+. En algunas alternativas, las células T de memoria están presentes en los subconjuntos CD62L+ y CD62L- de los linfocitos de sangre periférica CD8+. Las PBMC se clasifican en fracciones CD62L-CD8+ y CD62L+CD8+ después de la tinción con anticuerpos anti-CD8 y anti-CD62L. En algunas alternativas, la expresión de marcadores fenotípicos de T_{CM} de memoria central incluyen CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 y/o CD127 y son negativos o bajos para la granzima B. En algunas alternativas, las células T de memoria central son células T CD45RO+, CD62L+, y/o CD8+. En algunas alternativas, el efector T_E es negativo para CD62L, CCR7, CD28 y/o CD127, y positivo para granzima B y/o perforina.

En algunas alternativas, los linfocitos T CD8+ no modificados se caracterizan por la expresión de marcadores fenotípicos de células T no modificados, incluidos CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD127 y/o CD45RA.

Las células T colaboradoras CD4+ se clasifican en células no modificadas, de memoria central y efectoras identificando poblaciones de células que tienen antígenos de superficie celular. Los linfocitos CD4+ se pueden obtener mediante métodos estándar. En algunas alternativas, las células T CD4+ no modificados son células T CD45RO-, CD45RA+, CD62L+ y/o CD4+. En algunas alternativas, las células CD4+ de memoria central son CD62L+ y/o CD45RO+. En algunas alternativas, las células CD4+ efectoras son CD62L- y/o CD45RO-.

Se puede determinar si una célula o población de células es positiva para un marcador de superficie celular particular mediante citometría de flujo usando tinción con un anticuerpo específico para el marcador de superficie y un anticuerpo de control de isotipo coincidente. Una población de células negativa para un marcador se refiere a la ausencia de tinción significativa de la población de células con el anticuerpo específico por encima del control de isotipo, positiva se refiere a la tinción uniforme de la población de células por encima del control de isotipo. En algunas alternativas, una disminución en la expresión de uno o más marcadores se refiere a la pérdida de 1 log₁₀ en la intensidad media de fluorescencia y/o disminución del porcentaje de células que exhiben el marcador de al menos el 20% de las células, el 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 100% de las células o cualquier % entre el 20 y el 100% cuando se compara con una población de células de referencia. En algunas alternativas, una población de células positiva para uno o marcadores se refiere a un porcentaje de células que exhiben el marcador de al menos el 50% de las células, el 55% de las células, el 60% de las células, el 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 o 100% de las células o cualquier % entre el 50 y el 100% cuando se compara con una población de células de referencia.

Se puede determinar si una célula o población de células es positiva para un marcador de superficie celular particular mediante citometría de flujo usando tinción con un anticuerpo específico para el marcador de superficie y un anticuerpo de control de isotipo coincidente. Una población de células negativa para un marcador se refiere a la ausencia de tinción significativa de la población de células con el anticuerpo específico por encima del control de isotipo, positiva se refiere a la tinción uniforme de la población de células por encima del control de isotipo. En algunas alternativas, una disminución en la expresión de uno o más marcadores se refiere a la pérdida de 1 log₁₀ en la intensidad media de fluorescencia y/o disminución del porcentaje de células que exhiben el marcador de al menos el 20% de las células, el 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 100% de las células o cualquier % entre el 20 y el 100% cuando se compara con una población de células de referencia. En algunas alternativas, un aumento se refiere a un aumento en la intensidad media de fluorescencia y/o a un aumento en el número de células en una población de células que son positivas para uno o un marcador dado, tal como una población en la que se refiere a un porcentaje de células que exhiben el marcador de al menos el 50% de las células, el 55% de las células, el 60% de las células, el 65% de las células, el 70% de las células, el 75% de las células, el 80% de las células, el 85% de las células, el 90% de la célula, el 95% de las células o el 100% de las células o cualquier % entre el 50 y el 100% exhiben el marcador, por ejemplo, cuando se compara con una población de células de referencia.

En algunas alternativas, las poblaciones de CD4+ y CD8+ que son específicas de antígeno pueden obtenerse estimulando linfocitos T no modificados o específicos de antígeno con antígeno. Por ejemplo, se pueden generar líneas o clones de células T específicas de antígeno para antígenos de citomegalovirus aislando células T de sujetos infectados y estimulando las células *in vitro* con el mismo antígeno. También se pueden usar células T no modificadas. Se puede utilizar cualquier número de antígenos de células tumorales como dianas para provocar respuestas de células T. En algunas alternativas, las composiciones de inmunoterapia celular adoptiva son útiles en el tratamiento de una enfermedad o trastorno que incluye un tumor sólido, neoplasia maligna hematológica, cáncer de mama o melanoma.

Modificación de poblaciones de linfocitos T

En algunas alternativas, se puede desear introducir genes funcionales en las células T para su uso 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 las células T transferidas; 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 a la expresión controlada del transgén. Esto se puede llevar a cabo de acuerdo con técnicas conocidas que serán evidentes para los expertos en la técnica basándose en la presente divulgación.

En algunas alternativas, las células T se modifican con un vector que codifica receptores quiméricos inducibles por fármacos 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 de antígeno quimérico bajo el control de un promotor inducible. En otras alternativas, las células se modifican con un vector que comprende un polinucleótido que codifica

una citocina, un receptor de quimiocina, un gen que regula la apoptosis o un gen que modula la señalización del punto de control bajo el control de un promotor inducible. En algunas alternativas, las células T se obtienen del sujeto a tratar, en otras alternativas, los linfocitos se obtienen de donantes humanos alogénicos, preferiblemente donantes humanos sanos. En algunas alternativas, la modulación de la señalización del punto de control inhibe los reguladores de puntos de control negativos. En algunas alternativas, el regulador de punto de control negativo comprende VISTA, LAG-3 y/o TIM3.

Se pueden construir receptores quiméricos 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 se pueden unir a uno o más módulos de señalización celular. En algunas alternativas, los módulos de señalización celular incluyen dominios transmembrana de CD3, dominios de señalización intracelular de CD3 y/o dominios transmembrana de CD28. En algunas alternativas, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio transmembrana de CD28 y un dominio de señalización unidos a un dominio intracelular de CD3 zeta. En algunas alternativas, un receptor quimérico también puede incluir un marcador de transducción tal como tEGFR.

En algunas alternativas, se puede introducir el mismo receptor quimérico o uno diferente en cada una de las poblaciones de linfocitos T CD4+ y/o CD8+. En algunas alternativas, el receptor quimérico en cada una de estas poblaciones tiene un dominio de unión al 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 las células T citotóxicas CD8+ es el mismo que el dominio de señalización intracelular de las células T colaboradoras CD4+. En otras alternativas, el dominio de señalización intracelular de las células T citotóxicas CD8+ es diferente al dominio de señalización intracelular de las células T colaboradoras CD4+.

En algunas alternativas, cada uno de los linfocitos T CD4 o CD8 puede clasificarse en células no modificadas de memoria central, memoria efectora o efectoras 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 células no modificadas, de memoria central, de memoria efectora o efectoras después de la transducción.

Como se describe en el presente documento, en algunas alternativas, las células CD4+ no modificadas son células T positivas para CD45RO-, CD45RA+, CD62L+ y/o CD4+. En algunas alternativas, las células CD4+ de memoria central son positivas para CD62L y/o positivas para CD45RO. En algunas alternativas, las células efectoras CD4+ son negativas para CD62L y/o negativas para CD45RO. Cada una de estas poblaciones se puede modificar independientemente con un receptor quimérico.

Como se describe, en algunas alternativas, las células T de memoria están presentes en los subconjuntos CD62L+ y CD62L- de los linfocitos de sangre periférica CD8+. Las PBMC se clasifican en fracciones CD62L-CD8+ y CD62L+ CD8+ después de la tinción con anticuerpos anti-CD8 y anti-CD62L. En algunas alternativas, la expresión de marcadores fenotípicos de las células T de memoria central (TCM) incluyen CD62L, CCR7, CD28, CD3 y/o CD127 y son negativas o bajas para granzima B. En algunas alternativas, las células T de memoria central son células T CD45RO+, CD62L+ y/o CD8+. En algunas alternativas, las células T efectoras (T_E) son negativas para CD62L, CCR7, CD28 y/o CD127, y positivas para granzima B y/o perforina. En algunas alternativas, los linfocitos T CD8+ no modificadas se caracterizan por CD8+, CD62L+, CD45RO+, CCR7+, CD28+ CD127+ y/o CD45RO+. Cada una de estas poblaciones se puede modificar independientemente con un receptor quimérico.

Se han desarrollado diversas técnicas de transducción que utilizan partículas de virus infecciosos recombinantes para el suministro de genes. Esto representa un enfoque actualmente preferido para la transducción de linfocitos T de la presente invención. Los vectores virales, que se han utilizado de esta manera, incluyen vectores virales derivados del virus simio 40, adenovirus, virus adenoasociados (AAV), vectores lentivirales y/o 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. Se han usado varias de las técnicas anteriores para transducir células hematopoyéticas o linfoides, incluyendo transfección con fosfato de calcio, fusión de protoplastos, electroporación e infección con adenovirus recombinantes, virus adenoasociados y vectores retrovirales. Los linfocitos T primarios se han transducido con éxito por electroporación y por infección retroviral o lentiviral.

Los vectores retrovirales y lentivirales proporcionan un método altamente eficaz para la transferencia de genes a células eucariotas. Además, la integración retroviral o lentiviral tiene lugar de forma controlada y da como resultado la integración estable de una o unas pocas copias de la nueva información genética por célula.

Se contempla que la sobreexpresión de un factor estimulante (por ejemplo, una linfocina o una citocina) puede ser tóxica para el individuo tratado. Por lo tanto, está dentro del alcance de la invención incluir segmentos de genes que hacen que las células T de la invención sean susceptibles a la 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. Los genes seleccionables negativos son conocidos en la técnica e incluyen,

entre otros, los siguientes: el gen de timidina quinasa de tipo I del virus del Herpes simple (TK HSV-I), que confiere sensibilidad al ganciclovir; el gen de la hipoxantina fosforribosiltransferasa celular (HPRT), el gen de la adenina fosforribosiltransferasa celular (APRT) y la citosina desaminasa bacteriana.

En algunas alternativas, puede ser útil incluir en las células T un marcador positivo que permita la selección de células del fenotipo seleccionable negativo *in vitro*. El marcador seleccionable positivo puede ser un gen que al ser introducido en la célula huésped expresa un fenotipo dominante que permite la selección positiva de células que portan el gen. Los genes de este tipo son conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, el gen de la higromicina-B fosfotransferasa (hph), que confiere resistencia a la higromicina B, el gen de la aminoglucósido fosfotransferasa (neo o aph) de Tn5, que codifica la resistencia al antibiótico G418, el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR), el gen de la adenosina desaminasa (ADA) y/o el gen de resistencia a múltiples fármacos (MDR).

Se pueden emplear una variedad de métodos para transducir linfocitos T, como es bien conocido en la técnica. En algunas alternativas, la transducción se lleva a cabo utilizando vectores lentivirales.

En algunas alternativas, las células CD4+ y CD8+ pueden modificarse cada una por separado con un vector de expresión que codifica un receptor quimérico para formar poblaciones definidas. En algunas alternativas, las células se pueden modificar por separado con un vector que comprende un polinucleótido bajo el control de un promotor constitutivo y un vector que comprende un polinucleótido que codifica una citocina o un receptor de quimiocina bajo el control de un promotor inducible.

En algunas alternativas, estas células se clasifican luego en subpoblaciones de células no modificadas de memoria central y efectoras como se describió anteriormente, clasificando los antígenos de la superficie celular únicos para cada una de esas poblaciones de células. Además, las poblaciones de células CD4+ o CD8+ pueden seleccionarse por su perfil de citocinas o actividades proliferativas. Por ejemplo, se pueden seleccionar linfocitos T CD4+ que tienen una producción mejorada de citocinas tales como IL-2, IL-4, IL-10, TNF α y/o IFN γ , en comparación con células transducidas simuladas o células CD8+ transducidas cuando se estimulan con antígeno. En otras alternativas, se seleccionan células T CD4+ no modificadas o de memoria central que tienen una producción mejorada de IL-2 y/o TNF α . Asimismo, se seleccionan las células CD8+ que tienen una producción mejorada de IFN γ , en comparación con las células CD8+ transducidas en forma simulada.

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

En otras alternativas más, se seleccionan células 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 demostrado que las células de memoria central CD8+ transducidas por receptor quimérico con una región espaciadora corta persisten *in vivo* después de la introducción en el animal durante 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.

La divulgación contempla que se utilizarán combinaciones de células T CD4+ y CD8+ en las composiciones. En una alternativa, las combinaciones de células CD4+ transducidas por receptor quimérico pueden combinarse con células CD8+ transducidas por receptor quimérico de la misma especificidad de ligando o combinarse con células T CD8+ que son específicas para un ligando tumoral distinto. En otras alternativas, las células CD8+ transducidas por receptor quimérico se combinan con células CD4+ transducidas por receptor quimérico específicas para un ligando diferente expresado en el tumor. En otra alternativa más, se combinan células CD4+ y CD8+ modificadas con receptor quimérico. En algunas alternativas, las células CD8+ y CD4+ se pueden combinar en diferentes proporciones, por ejemplo, una proporción 1:1 de CD8+ y CD4+, una proporción de 10:1 de CD8+ a CD4+, o una proporción de 100:1 de CD8+ a CD4+, o cualquier otra proporción de CD8+ a CD4+ que se encuentre entre cualquiera de las proporciones enumeradas. En algunas alternativas, la población combinada se prueba para determinar la proliferación celular *in vitro* y/o *in vivo*, y se selecciona la proporción de células que proporciona la proliferación de células.

Después de la transducción y/o selección de células portadoras de receptores quiméricos, las poblaciones de células se expanden preferiblemente *in vitro* hasta que se obtiene un número suficiente de células para proporcionar al menos una infusión en un sujeto humano, típicamente alrededor de 10^4 células/kg a 10^9 células/kg. En algunas alternativas, las células transducidas se cultivan en presencia de células portadoras de antígenos, anti CD3, anti-CD28 e IL-2, IL-7, IL-15 o IL-21 o combinaciones de los mismos.

En algunas alternativas, se seleccionan células CD4+ y CD8+ que proliferan en respuesta a la estimulación de citocinas, antígenos o dianas tumorales *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, se seleccionan células transducidas CD4+ o CD8+ que proliferan vigorosamente cuando se estimulan con anti-ICD3 y/o anti-CD28. En algunas alternativas, la estimulación de células transducidas proporciona una expresión transgénica mejorada en presencia de un inductor (por ejemplo, un fármaco) de esos genes trans bajo el control de un promotor inducible.

Cada una de las subpoblaciones de células CD4+ y CD8+ se puede combinar entre sí. En una alternativa específica, se combinan células CD4+ modificadas, de memoria central o no modificadas con células T CD8+ de memoria central modificadas para proporcionar un efecto citotóxico sinérgico sobre las células portadoras de antígenos, tales como las células tumorales.

5

Composiciones

La divulgación proporciona una composición de inmunoterapia celular adoptiva que comprende una preparación de células linfocíticas T modificadas genéticamente como se describe en el presente documento. En algunas alternativas, la preparación de células linfocíticas T comprende células T CD4+ que tienen un receptor quimérico que comprende un dominio variable de anticuerpo extracelular específico para un ligando asociado con la enfermedad o trastorno, una región espaciadora, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de un receptor de células T u otros receptores bajo el control de un promotor inducible por fármacos como se describe en el presente documento. En otras alternativas, una composición de inmunoterapia celular adoptiva comprende además una preparación de células linfocíticas T citotóxicas CD8+ específicas de tumor modificadas con receptor quimérico que proporciona una respuesta inmune celular, en la que la preparación de células linfocíticas T citotóxicas comprende células T CD8+ que tienen un receptor quimérico que comprende un anticuerpo de cadena sencilla extracelular específico para un ligando asociado con la enfermedad o trastorno, una región espaciadora, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de un receptor de células T bajo el control de un promotor inducible por fármacos como se describe en el presente documento. En algunas alternativas, la población de células T modificadas con el receptor quimérico de la divulgación puede persistir *in vivo* durante al menos 3 días o más. Como alternativa, cada una de estas poblaciones se puede combinar entre sí o con otros tipos de células para proporcionar una composición.

En algunas alternativas, las células linfocíticas T colaboradoras CD4+ son células T CD4+ no modificadas, células T CD4+ de memoria central, células T CD4+ de memoria efectora o células T CD4+ a granel. En algunas alternativas, la célula linfocítica T colaboradora CD4+ es una célula T CD4+ no modificada, en el que la célula T CD4+ no modificada comprende una célula T CD45RO-, CD45RA+ y/o es una célula T CD62L+ CD4+.

En algunas alternativas, la célula linfocítica citotóxica T CD8+ es una célula T CD8+ no modificada, una célula T CD8+ de memoria central, una célula T CD8+ de memoria efectora y/o una célula T CD8+ a granel. En algunas alternativas, la célula linfocítica T citotóxica CD8+ es una célula T de memoria central, en la que la célula T de memoria central comprende una célula T CD45RO+, CD62L+ y/o CD8+. En otras alternativas más, la célula linfocítica T citotóxica CD8+ es una célula T de memoria central y la célula linfocítica T colaboradora CD4+ es una célula T CD4+ de memoria central o no modificada.

En algunas alternativas, las composiciones comprenden precursores de células T. En algunas alternativas, las composiciones comprenden células madre hematopoyéticas. En algunas alternativas, la composición comprende una célula huésped en la que la célula huésped es una célula linfocítica T citotóxica CD8+ seleccionada del grupo que consiste en células T CD8+ no modificadas, células T CD8+ de memoria central, células T CD8+ de memoria efectora y células T CD8+ a granel o un célula linfocítica T colaboradora CD4+ que se selecciona del grupo que consiste en células T CD4+ no modificadas, células T CD4+ de memoria central, células T CD4+ de memoria efectora y células T CD4+ a granel y una segunda célula huésped, en la que la segunda célula huésped es una célula T precursora. En algunas alternativas, la célula T precursora es una célula madre hematopoyética.

Métodos

La divulgación proporciona métodos para preparar composiciones de inmunoterapia adoptiva y usos o métodos para utilizar estas composiciones para realizar inmunoterapia celular en un sujeto que padece una enfermedad o trastorno. En algunas alternativas, un método de fabricación de las composiciones comprende obtener una célula T colaboradora modificada CD4+ de memoria central o no modificada, en la que la preparación de células linfocíticas T colaboradoras modificadas comprende células T CD4+ que tienen un receptor quimérico que comprende un dominio de unión al ligando específico para una molécula de superficie célula tumoral, un dominio espaciador, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular bajo el control de un promotor inducible como se describe en el presente documento. En otras alternativas, las células CD4+ tienen un receptor de citocina o quimiocina bajo el control de un promotor inducible.

En otra alternativa, un método comprende además obtener una célula T de memoria central CD8+ modificada, en la que la preparación de la célula linfocítica T CD8 de memoria central modificada comprende células CD8+ que tienen un receptor quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el dominio de unión al ligando es específico para un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito, un dominio espaciador, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular bajo el control del promotor inducible como se describe en el presente documento. En otras alternativas, las células CD4+ tienen un receptor de citocina o quimiocina bajo el control de un promotor inducible.

65

El promotor inducible por fármacos tanto en células T CD4+ modificadas como en células T citotóxicas CD8+ modificadas puede ser el mismo o diferente. En algunas alternativas, en una población de células el promotor unido al receptor de antígeno quimérico es un promotor constitutivo y en la otra población es un promotor inducible. Por ejemplo, las células T CD4+ modificadas que tienen un receptor quimérico que comprende un dominio de unión al ligando específico para una molécula de superficie de la célula tumoral, un dominio espaciador, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular bajo el control de un promotor constitutivo, mientras que la célula T citotóxica CD8+ comprende células CD8+ que tienen un receptor quimérico que comprende un dominio de unión al ligando específico para una molécula de superficie de célula tumoral, un dominio espaciador, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular bajo el control del promotor inducible.

En algunas alternativas, el polinucleótido puede codificar un receptor de antígeno quimérico que difiere en la población de células CD4+ frente a células CD8+. La diferencia entre las dos constructos puede incluir la especificidad o afinidad del dominio de unión al ligando por un antígeno o epítipo, la longitud y secuencia de la región espaciadora y los componentes de señalización intracelular.

La preparación de las células CD4+ y CD8+ que se modifican con un receptor quimérico se describe a lo largo de esta descripción. 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/o 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.

En algunas alternativas, la combinación de poblaciones de células puede evaluarse para determinar la uniformidad de los productores de la superficie celular, la capacidad de proliferar durante al menos dos generaciones, para tener un estado de diferenciación celular uniforme. El control de calidad se puede realizar cocultivando una línea celular que exprese el ligando diana con células T modificadas con receptor quimérico y el fármaco que induce la expresión del receptor de antígeno quimérico para determinar si las células T modificadas con receptor quimérico reconocen la línea celular usando ensayos de citotoxicidad, proliferación, o producción de citocinas en presencia del inductor que se conocen en la técnica. El estado de diferenciación celular y los marcadores de superficie celular en las células T modificadas con receptor quimérico pueden determinarse mediante citometría de flujo. En algunas alternativas, los marcadores y el estado de diferenciación celular en las células 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 las células CD4+ incluyen CD3, CD4, CD62L, CD28, CD27, CD69, CD25, PD-1, CTLA-4 CD45RO y/o CD45RA.

En algunas alternativas, las células T modificadas con receptor quimérico como se describen en el presente documento pueden persistir *in vivo* durante al menos 3 días, o al menos 10 días. En algunas alternativas, las células T modificadas con receptor quimérico, como se describe en el presente documento, pueden proliferar *in vivo* durante al menos 2, o al menos 3 generaciones, como se determina mediante dilución del colorante CFSE. La proliferación y persistencia de las células T modificadas con receptor quimérico se puede determinar usando un modelo animal de la enfermedad o trastorno y administrando las células y determinando la persistencia y/o la capacidad proliferativa de las células transferidas. En otras alternativas, la proliferación y activación pueden probarse *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 tiene una enfermedad o trastorno que comprende: administrar una composición de linfocitos que expresan un receptor quimérico bajo el control de un promotor inducible por fármacos como se describe en este documento, y administrar el fármaco.

En algunas alternativas, el fármaco es tamoxifeno, variantes, derivados, sales farmacéuticas, solvatos e hidratos de los mismos como se describe en el presente documento. En algunas alternativas, el fármaco se administra antes, al mismo tiempo que la composición o en momentos posteriores a la administración de la composición.

En algunas alternativas, el fármaco se administra con la composición, y si se observa un efecto tóxico de la composición, el fármaco se retira hasta que disminuyan los efectos tóxicos. Una vez que los síntomas de toxicidad disminuyen, se vuelve a administrar el fármaco. En algunas alternativas, se puede volver a administrar un fármaco una vez que disminuyen los síntomas de toxicidad.

En algunas alternativas, el fármaco se administra con la composición, pero una vez que el sujeto tiene una disminución en la carga tumoral o en las células cancerosas, el fármaco se retira durante un período de tiempo para permitir que las células modificadas descansen y si no hay actividad de las células modificadas, las células modificadas no son necesarias debido a la remisión del cáncer.

En otras alternativas, un método comprende administrar al sujeto una preparación de células linfocíticas T citotóxicas modificados genéticamente que proporciona una respuesta inmune celular, en la que la preparación de células linfocíticas T citotóxicas comprende células T CD8+ que tienen un receptor quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el dominio de unión al ligando es específico para un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana,

en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito, un dominio espaciador, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular bajo el control de un promotor inducible por fármacos como se describe en este documento, y/o una preparación de células linfocíticas T colaboradoras modificadas genéticamente que provocan el reconocimiento directo de tumores y aumenta la capacidad de las preparaciones de células linfocíticas T citotóxicas modificadas genéticamente para mediar una respuesta inmune celular, en la que la preparación de células linfocíticas T colaboradoras comprende células T CD4+ que tienen un receptor quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el dominio de unión al ligando es específico para un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito, un dominio espaciador, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular bajo el control de un promotor constitutivo o inducible por fármacos como se describe en el presente documento y administrar el fármaco que induce el promotor inducible. En algunas alternativas, la administración del fármaco se realiza después de la administración de la composición o células huésped, en las que la administración se realiza 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 2 semanas, 4 semanas o dos meses, o cualquier período de tiempo entre dos valores cualquiera de tiempo enumerados.

En otras alternativas, un método comprende administrar al sujeto una preparación de células linfocíticas T citotóxicas modificadas genéticamente que proporciona una respuesta inmune celular, en la que la preparación de células linfocíticas T citotóxicas comprende células T CD8+ que tienen un receptor quimérico que comprende un dominio de unión al ligando específico para una molécula de superficie de la célula tumoral, un dominio espaciador, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular bajo el control de un promotor constitutivo como se describe en este documento, y/o una preparación de células linfocíticas T colaboradoras modificadas genéticamente que provocan el reconocimiento directo del tumor y aumenta la capacidad de las preparaciones de linfocitos T citotóxicos modificados genéticamente para mediar una respuesta inmune celular, en la que la preparación de células linfocíticas T colaboradoras comprende células T CD4+ que tienen un receptor quimérico que comprende un dominio de unión al ligando específico para una molécula de superficie de la célula tumoral, un dominio espaciador, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular bajo el control de un promotor constitutivo o inducible por fármaco como se describe en este documento y administrar el fármaco que induce el promotor inducible. En algunas alternativas, la molécula específica del tumor es una molécula de la superficie del tumor.

En otras alternativas, un método comprende administrar al sujeto una preparación de células linfocíticas T citotóxicas modificadas genéticamente que proporciona una respuesta inmune celular, en la que la preparación de células linfocíticas T citotóxicas comprende células T CD8+ que expresan una citocina, un receptor de quimiocina, un polipéptido que regula la apoptosis y/o un polipéptido que modula la señalización del punto de control bajo el control de un promotor inducible como se describe en este documento, y/o una preparación de células linfocíticas T colaboradoras modificadas genéticamente que provoca el reconocimiento directo de tumores y aumenta la capacidad de las preparaciones de células linfocíticas T citotóxicas modificadas genéticamente para mediar una respuesta inmune celular, en la que la preparación de células linfocíticas T colaboradoras comprende células T CD4+ que expresan una citocina, un receptor de quimiocinas, un polipéptido que regula la apoptosis y/o un polipéptido que modula la señalización del punto de control bajo el control de un promotor constitutivo o inducible por fármaco como se describe en este documento y administrar el fármaco que induce al promotor inducible. En algunas alternativas, una o más de las poblaciones de células expresa un receptor de antígeno quimérico bajo el control de un promotor constitutivo. En algunas alternativas, la modulación de la señalización del punto de control inhibe los reguladores de puntos de control negativos. En algunas alternativas, el regulador de punto de control negativo comprende VISTA, LAG-3 y/o TIM3.

Una cantidad eficaz del fármaco para la inducción es una cantidad del fármaco que proporciona la inducción del receptor de antígeno quimérico en al menos 5%, al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40 %, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 100% o cualquier número entre cualquiera de los valores porcentuales enumerados de las células transducidas.

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

Los sujetos que pueden tratarse mediante la presente invención son, en general, seres humanos y otros primates, tales como monos y simios con fines de medicina veterinaria. Los sujetos pueden ser machos o hembras y pueden tener cualquier edad adecuada, incluidos sujetos lactantes, juveniles, adolescentes, adultos y geriátricos.

Los métodos son útiles en el tratamiento o inhibición de, por ejemplo, neoplasia maligna hematológica, melanoma, cáncer de mama, cáncer de cerebro y otras neoplasias malignas epiteliales o tumores sólidos. En algunas alternativas, la molécula asociada con la enfermedad o trastorno es un receptor de tirosina quinasa huérfano ROR1, Her2, EGFR, CE7, hB7H3, CD19, CD20, CD22, mesotelina, CEA o un antígeno de superficie de la hepatitis B.

Los sujetos que se pueden abordar usando los métodos descritos en este documento incluyen sujetos identificados o seleccionados con cáncer, que incluyen, entre otros, cáncer de colon, pulmón, hígado, mama, riñón, próstata, ovario, piel (incluido melanoma), óseo y cerebro, etc. Dicha identificación y/o selección puede realizarse mediante evaluación clínica o de diagnóstico. En algunas alternativas se conocen los antígenos o moléculas asociados a tumores, tales como melanoma, cáncer de mama, cáncer de cerebro, carcinoma de células escamosas, cáncer de colon, leucemia, mieloma y/o cáncer de próstata. En otras alternativas, las moléculas asociadas a tumores pueden dirigirse a células T modificadas genéticamente que expresan un receptor quimérico modificado. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, linfoma de células B, cáncer de mama, cáncer de cerebro, cáncer de próstata y/o leucemia.

Las células preparadas como se describió anteriormente se pueden utilizar 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 técnica basándose en la presente divulgación.

En algunas alternativas, las células se formulan recogiendo primero de su medio de cultivo y luego lavando y concentrando las células en un medio y un sistema de contenedores adecuados para la administración (un portador "farmacéuticamente aceptable") en una cantidad eficaz para el tratamiento. El medio de infusión adecuado puede ser cualquier formulación de medio isotónico, típicamente solución salina normal, Normosol R (Abbott) o Plasma-Lyte A (Baxter), pero también se puede utilizar dextrosa al 5% en agua o lactato de Ringer. El medio de infusión se puede complementar con albúmina de suero humano, suero bovino fetal u otros componentes del suero humano.

En algunas alternativas, un tratamiento o una cantidad inhibidora eficaz de células en la composición es una célula CD4 o CD8 transducida o al menos 2 subconjuntos de células (por ejemplo, un subconjunto de células T de memoria central CD8+ y un subconjunto de células T colaboradoras CD4+) o es más típicamente mayor de 10^2 células, y hasta 10^6 , hasta e incluyendo 10^8 o 10^9 células y puede ser más de 10^{10} células. El número de células dependerá del uso final para el que está destinada la composición, así como del tipo de células incluidas en la misma. Por ejemplo, si se desean células que sean específicas para un antígeno particular, entonces la población contendrá más del 70%, generalmente más del 80%, 85% y 90-95% de tales células. Para los usos proporcionados en el presente documento, las células están generalmente en un volumen de un litro o menos, pueden ser 500 ml o menos, incluso 250 ml o 100 ml o menos o un volumen entre dos cualesquiera de los valores de volumen enumerados. Por lo tanto, la densidad de las células deseadas es típicamente mayor que 10^4 células/ml y generalmente es mayor que 10^7 células/ml, generalmente 10^8 células/ml o más. El número clínicamente relevante de células inmunes 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 definidas entre dos puntos finales de cualquiera de los valores enumerados.

En algunas alternativas, los linfocitos de la invención pueden usarse para conferir inmunidad a los individuos. Por "inmunidad" se entiende una disminución de uno o más síntomas físicos asociados con una respuesta a la infección por un patógeno, o un tumor, al que se dirige la respuesta de los linfocitos. 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 normalmente por infusión, con cada infusión en un intervalo de 2 células, hasta al menos 10^6 a 3×10^{10} células, preferiblemente en el intervalo de al menos 10^7 a 10^9 células. Las células T pueden administrarse mediante una única infusión o mediante múltiples infusiones durante un intervalo de tiempo. Sin embargo, dado que se espera que los diferentes individuos varíen en la capacidad de respuesta, 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 son determinados por el médico tratante y pueden ser determinados por examen de rutina. La generación de niveles suficientes de linfocitos T (incluidos linfocitos T citotóxicos y/o linfocitos T colaboradores) se puede lograr fácilmente usando el método de expansión rápida de la presente invención, como se ejemplifica en el presente documento.

En algunas alternativas, una composición como se describe en el presente documento se administra a un sujeto identificado o seleccionado, tal como un sujeto identificado o seleccionado por tener melanoma, cáncer de mama, cáncer de cerebro, carcinoma de células escamosas, cáncer de colon, leucemia, mieloma y/o cáncer de próstata, por vía intravenosa, intraperitoneal, intratumoral, en la médula ósea, en el ganglio linfático y/o en el líquido cefalorraquídeo. En algunas alternativas, las composiciones modificadas del receptor quimérico se administran al sitio del tumor. Alternativamente, las composiciones como se describen en el presente documento se pueden combinar con un compuesto que dirija las células al tumor o los compartimentos del sistema inmunológico y evite sitios tales como el pulmón.

En algunas alternativas, las composiciones descritas en el presente documento se administran con agentes quimioterapéuticos y/o inmunosupresores. Como alternativa, a un paciente se le administra primero un agente quimioterapéutico que inhibe o destruye otras células inmunes seguido de las composiciones descritas en este documento. En algunos casos, la quimioterapia se puede evitar por completo.

En algunas alternativas, un método que comprende administrar las células T modificadas como se describe en el presente documento en combinación con el inductor (por ejemplo, fármaco inducible) hasta que se reduce la carga tumoral. Una vez que se reduce la carga tumoral, el fármaco inductor se puede retirar para desactivar la expresión del receptor de antígeno quimérico y disminuir el número de células T que expresan el receptor. En otras alternativas, el

fármaco inductor se puede administrar en diferentes momentos para activar la expresión del receptor de antígeno quimérico en caso de recaída o aumento del crecimiento tumoral.

En otras alternativas, el fármaco inductor puede administrarse durante un período de días, semanas o meses, y luego retirarse durante días, semanas o meses, seguido de una nueva administración del fármaco inductor durante días, semanas o meses para permitir el ciclo de la expresión del receptor del antígeno quimérico para evitar la anergia o la falta de respuesta debido a la estimulación crónica de las células.

Construcción de vectores y preparación de lentivirus doblemente empaquetado

Se construyó un vector lentiviral inducible que codifica 7xHBD/mE1b-CD19t-her2t-T2A-epHIV7. Los receptores quiméricos específicos de CD19t se construyeron usando: (1) los segmentos de cadena VL y VH del mAb FMC63 específico de CD19 (SEQ ID NO: 3), unidos mediante un péptido enlazador (G_4S)₃ (SEQ ID NO: 12) (VL-enlazador-VH); (2) un dominio espaciador derivado de la bisagra de Fc de IgG4 únicamente (12 AA codificados por la (SEQ ID NO: 4)). Los espaciadores contenían una sustitución S → P dentro del dominio bisagra ubicado en la posición 108 de la proteína nativa de Fc de IgG4; el dominio transmembrana de 27 AA de CD28 humano (Base de datos Uniprot: P10747, (SEQ ID NO: 14)); (4) un módulo de señalización que comprende (i) el dominio citoplasmático de 41 AA de CD28 humano con una sustitución de LL → GG ubicada en la posición 186-187 de la proteína CD28 nativa (SEQ ID NO: 14); y/o (ii) el dominio citoplasmático de 42 AA de 4-1BB humano (Base de datos Uniprot: Q07011, (SEQ ID NO: 15)); unido a (iii) el dominio citoplasmático de 112 AA de la isoforma 3 de CD3ζ humano (Base de datos Uniprot: P20963, (SEQ ID NO: 16)).

Las secuencias de ácido nucleico que codifican CD19t se unieron con secuencias que codifican Her2t (SEQ ID NO: 44); y la secuencia de T2A autoescindible (SEQ ID NO: 8).

Se construyó un vector lentiviral condicional que codifica 7xHBD/mEF1ap-ZsGreen-epHIV7. El promotor sintético 7xHBD/mEF1ap se construyó combinando siete sitios mínimos de la familia nuclear de hepatocitos 1 (HNF-1) clonados a partir del promotor de albúmina humana y la caja TATA del promotor huEF1α y tiene una secuencia de (SEQ ID NO: 41). De esta manera, solo en presencia de tamoxifeno la unión de HEA-3 al promotor 7xHBD/EF1mp induce el estado "ACTIVADO" de la expresión del transgén.

Se construyó un vector lentiviral condicional que codifica 7xHBD/mEF1ap-CD19t-T2A-DHFRdm_epHIV7. Los receptores quiméricos específicos de CD19t se construyeron usando: (1) los segmentos de cadena VL y VH del mAb FMC63 específico de CD19 (SEQ ID NO: 3), unidos por un péptido enlazador (G_4S)₃ (SEQ ID NO: 12) (VL-enlazador-VH); (2) un dominio espaciador derivado de la bisagra de Fc de IgG4 solamente (12 AA codificados por la (SEQ ID NO: 4)). Los espaciadores contenían una sustitución de S → P dentro del dominio bisagra ubicado en la posición 108 de la proteína nativa de Fc de IgG4; el dominio transmembrana de 27 AA de CD28 humano (Base de datos Uniprot: P10747, (SEQ ID NO: 14)); (4) un módulo de señalización que comprende (i) el dominio citoplasmático de 41 AA de CD28 humano con una sustitución de LL → GG ubicada en la posición 186-187 de la proteína CD28 nativa (SEQ ID NO: 14); y/o (ii) el dominio citoplasmático de 42 AA de 4-1BB humano (Base de datos Uniprot: Q07011, (SEQ ID NO: 15)); unido a (iii) el dominio citoplasmático de 112 AA de la isoforma 3 de CD3ζ humano (Base de datos Uniprot: P20963, (SEQ ID NO: 16)).

Las secuencias de ácido nucleico que codifican CD19t se unieron con secuencias que codifican la secuencia de T2A autoescindible (SEQ ID NO: 8); y DHFRdm (SEQ ID NO: 46).

El regulador transcripcional, HEA-3, es un factor de transcripción quimérico compuesto por subunidades humanas que incluyen el dominio de unión al ADN del extremo terminal N del factor nuclear de hepatocitos 1-alfa (HNF-1α) fusionado en marco al dominio mutante de unión al ligando específico de tamoxifeno del dominio de unión al ligando del receptor de estrógenos (ER-LBD), que a su vez se fusiona con el dominio de activación de p65 de NF-κβ (p65). En ausencia de tamoxifeno, HEA-3 se excluye del núcleo mediante la unión de la proteína de choque térmico citosólico 90 (HSP90) al sitio activo de unión de tamoxifeno y la expresión del transgén está en el estado "DESACTIVADO". Las concentraciones nanomolares de tamoxifeno citosólico superan activamente a HSP90 en la unión de ER-LBD, lo que resulta en la translocación de HEA-3 al núcleo. Tras la translocación nuclear, HEA-3 está fácilmente disponible para unirse a su promotor sintético restringido. La capacidad de respuesta transcripcional a HEA-3 en presencia de tamoxifeno se logra cuando los transgenes se colocan detrás de un promotor sintético que responde a HEA-3 (7xHBD/EF1mp).

Se construyó un constructo constitutivo con un promotor constitutivo EF-1α unido a un polinucleótido que codifica un activador transcripcional HEA-3 (SEQ ID NO: 39) y una secuencia marcadora EGFRt (SEQ ID NO: 9).

Se sintetizaron secuencias de nucleótidos optimizados por codones humanos que codifican cada transgén (Life Technologies, Carlsbad, CA) y se clonaron en el vector lentiviral epHIV7 usando sitios de restricción NheI y NotI. El vector lentiviral epHIV7 se había derivado del vector pHIV7 reemplazando el promotor de citomegalovirus de pHIV7 con un promotor de EF-1.

El receptor quimérico inducible de CD19 codificante y el lentivirus constitutivo se produjo en células 293T cotransfectadas con el vector lentiviral y los vectores de empaquetamiento pCHGP-2, pCMV-Rev2 y pCMV-G usando reactivo de transfección Calfos (Clontech). El medio se cambió 16 horas después de la transfección y el lentivirus se recogió después de 24, 48 y 72 horas.

Generación de líneas de células T Jurkat que expresan los receptores quiméricos CD19 y ZsGreen cuando se inducen con tamoxifeno.

Se transdujeron células Jurkat con sobrenadante lentiviral (MOI = 3) suplementado con 1 µg/ml de polibreno (Millipore) el día 3 después de la activación mediante centrifugación a 2.100 rpm durante 45 minutos a 32 °C. Las células T se expandieron en RPM1, suero humano al 10%, L-glutamina 2 mM y penicilina-estreptomicina al 1% (medio CTL), suplementado con 1L-2 humano recombinante (rh) hasta una concentración final de 50 U/ml cada 48 horas.

Alternativas adicionales

En algunas alternativas, se proporciona un sistema para la expresión inducible de un receptor de antígeno quimérico, en el que el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el dominio de unión al ligando es específico para un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador es un polinucleótido optimizado que codifica un dominio transmembrana; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular; y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido a un ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el espaciador está optimizado para una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia. En algunas alternativas, el fármaco es el tamoxifeno y/o sus metabolitos. En algunas alternativas, el primer promotor comprende una secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 41. En algunas alternativas, el segundo promotor es un promotor constitutivo. En algunas alternativas, el segundo promotor es el EFlap. En algunas alternativas, el activador transcripcional comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 40. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además un primer vector y el segundo ácido nucleico comprende además un segundo vector. En algunas alternativas, ambos vectores se empaquetan en un vector viral. En algunas alternativas, el vector viral es un lentivirus. En algunas alternativas, el primer y segundo ácido nucleico comprenden un vector. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un marcador seleccionable. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable.

En algunas alternativas, un sistema para la expresión inducible de un receptor de antígeno quimérico comprende: un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica una citocina, una quimiocina, un polipéptido que regula la apoptosis y/o un polipéptido que modula la señalización del punto de control; y un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido a un ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el segundo promotor es constitutivo o inducible. En un ejemplo alternativo, el segundo ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico, bajo el control de un promotor constitutivo.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona composiciones para conferir y/o aumentar las respuestas inmunitarias mediadas por inmunoterapia celular, tal como mediante la transferencia adoptiva de células T CD4+ modificadas genéticamente, específicas del subconjunto específico del tumor, en la que las células T CD4+ confieren y/o aumentan la capacidad de las células T CD8+ para mantener la reactividad antitumoral y aumentar y/o maximizar la proliferación específica del tumor. En algunas alternativas, las células CD4+ se modifican genéticamente para expresar un ácido nucleico receptor quimérico y/o polipéptido receptor quimérico bajo el control de un promotor regulado como se describe en el presente documento.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona composiciones para conferir y/o aumentar las respuestas inmunitarias mediadas por inmunoterapia celular, tal como mediante la transferencia adoptiva de células T CD8+ modificadas genéticamente específicas del subconjunto específico del tumor. En algunas alternativas, las células T CD8+ expresan un ácido nucleico receptor quimérico y/o polipéptido receptor quimérico bajo el control de un promotor regulado, como se describe en el presente documento.

En una alternativa, la presente divulgación proporciona un método para realizar inmunoterapia celular en un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno administrando al sujeto una preparación de células linfocíticas T modificadas genéticamente que proporciona una respuesta inmune celular y administrar un fármaco que induce un transgén en las células linfocíticas T modificadas genéticamente.

En algunas alternativas, se coadministran la población de células CD8+ modificadas genéticamente y CD4+ modificadas genéticamente. En algunas alternativas, las células T son células T autólogas o alogénicas. Son posibles varias modificaciones del método anterior. Por ejemplo, el receptor quimérico que expresa las células T CD4+ y las células T CD8+ puede ser el mismo o diferente.

En algunas alternativas, se proporciona un sistema para la expresión inducible de un receptor de antígeno quimérico, en el que el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el dominio de unión al ligando es específico para un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular; y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido al ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el segundo promotor es constitutivo o inducible. En algunas alternativas, el fármaco es el tamoxifeno y/o sus metabolitos. En algunas alternativas, el primer promotor comprende una secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 41. En algunas alternativas, el segundo promotor es un promotor constitutivo. En algunas alternativas, el segundo promotor es el EFlap. En algunas alternativas, el activador transcripcional comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 40. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además un primer vector y el segundo ácido nucleico comprende además un segundo vector. En algunas alternativas, ambos vectores se empaquetan en un vector viral. En algunas alternativas, el vector viral es un lentivirus. En algunas alternativas, el primer y segundo ácido nucleico comprenden un vector. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un marcador seleccionable. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable. En algunas alternativas, el espaciador está optimizado para una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia.

En algunas alternativas, se proporciona un sistema para la expresión inducible del receptor de antígeno quimérico, en el que el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica una citocina, un receptor de quimiocina, un polipéptido que regula la apoptosis o un polipéptido que modula la señalización del punto de control; y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido al ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el polipéptido que modula la señalización del punto de control inhibe los reguladores de puntos de control negativos. En algunas alternativas, el regulador de punto de control negativo comprende VISTA, LAG-3 y/o TIM3. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica el receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el espaciador está optimizado para una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana. En algunas alternativas, el primer promotor está en orientación opuesta al segundo promotor. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento de anticuerpo. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento variable de cadena sencilla. En algunas alternativas, la molécula específica del tumor es CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, CE7, EGFR, hB7H3, mesotelina, c-Met, PSMA, Her2, GD-2 o MAGE A3 TCR o combinaciones de las mismas. En algunas alternativas, el segundo promotor es un promotor inducible o un promotor constitutivo.

En algunas alternativas, se proporciona un polipéptido receptor quimérico, en el que el polipéptido receptor quimérico está codificado por un sistema. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el dominio de unión al ligando es específico para un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito, un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana, y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular, y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido al ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el fármaco es tamoxifeno y/o sus metabolitos. En algunas alternativas, el primer promotor comprende una secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 41. En algunas alternativas, el segundo promotor es un promotor constitutivo. En algunas alternativas, el segundo promotor es el EFlap. En algunas alternativas, el activador transcripcional comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 40. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además un primer vector y el segundo ácido nucleico comprende además un segundo vector. En algunas alternativas, ambos vectores se empaquetan en un vector viral.

En algunas alternativas, el vector viral es un lentivirus. En algunas alternativas, el primer y segundo ácido nucleico comprenden un vector. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un marcador seleccionable. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica una citocina, un receptor de quimiocinas, un polipéptido que regula la apoptosis o un polipéptido que modula la señalización del punto de control y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido al ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el polipéptido que modula la señalización del punto de control inhibe los reguladores de puntos de control negativos. En algunas alternativas, el regulador de punto de control negativo comprende VISTA, LAG-3 y/o TIM3. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica el receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el espaciador está optimizado para una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia. En algunas alternativas, el primer promotor está en orientación opuesta al segundo promotor. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento de anticuerpo. En algunas alternativas, la molécula específica del tumor se selecciona del grupo que consiste en CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, CE7, EGFR, hB7H3, mesotelina, c-Met, PSMA, Her2, GD-2 y MAGE A3 TCR o combinaciones de las mismas. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica una citocina, un receptor de quimiocinas, un polipéptido que regula la apoptosis o un polipéptido que modula la señalización del punto de control; y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor constitutivo o inducible unido operativamente a un ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el polipéptido que modula la señalización del punto de control inhibe los reguladores de los puntos de control negativos. En algunas alternativas, el regulador de punto de control negativo comprende VISTA, LAG-3 y/o TIM3. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica al receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el espaciador está optimizado para una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana. En algunas alternativas, el primer promotor está en orientación opuesta al segundo promotor. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento de anticuerpo. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento variable de cadena sencilla. En algunas alternativas, la molécula específica del tumor se selecciona del grupo que consiste en CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, CE7, EGFR, hB7H3, mesotelina, c-Met, PSMA, Her2, GD-2 y MAGE A3 TCR o combinaciones de las mismas. En algunas alternativas, el espaciador está optimizado para una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia. En algunas alternativas, el segundo promotor es un promotor inducible. En algunas alternativas, el segundo promotor es el promotor constitutivo.

En algunas alternativas, se proporciona una célula huésped, en la que la célula huésped comprende un sistema. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el dominio de unión al ligando es específico para un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito, un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana, y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular, y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido al ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el fármaco es tamoxifeno y/o sus metabolitos. En algunas alternativas, el primer promotor comprende una secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 41. En algunas alternativas, el segundo promotor es un promotor constitutivo. En algunas alternativas, el segundo promotor es el EFlap. En algunas alternativas, el activador transcripcional comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 40. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además un primer vector y el segundo ácido nucleico comprende además un segundo vector. En algunas alternativas, ambos vectores se empaquetan en un vector viral. En algunas alternativas, el vector viral es un lentivirus. En algunas alternativas, el primer y segundo ácido nucleico comprenden un vector. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un marcador seleccionable. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende

un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica una citocina, un receptor de quimiocinas, un polipéptido que regula la apoptosis o un polipéptido que modula la señalización del punto de control y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido al ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible.

En algunas alternativas, el polipéptido que modula la señalización del punto de control inhibe los reguladores de puntos de control negativos. En algunas alternativas, el regulador de punto de control negativo comprende VISTA, LAG-3 y/o TIM3. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica el receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el espaciador está optimizado para una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia. En algunas alternativas, el primer promotor está en orientación opuesta al segundo promotor. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento de anticuerpo. En algunas alternativas, la molécula específica del tumor se selecciona del grupo que consiste en CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, CE7, EGFR, hB7H3, mesotelina, c-Met, PSMA, Her2, GD-2 y MAGE A3 TCR o combinaciones de las mismas. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica una citocina, un receptor de quimiocinas, un polipéptido que regula la apoptosis o un polipéptido que modula la señalización del punto de control; y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor constitutivo o inducible unido operativamente a un ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el polipéptido que modula la señalización del punto de control inhibe los reguladores de puntos de control negativos. En algunas alternativas, el regulador de punto de control negativo comprende VISTA, LAG-3 y/o TIM3. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica el receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el espaciador está optimizado para una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana. En algunas alternativas, el primer promotor está en orientación opuesta al segundo promotor. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento de anticuerpo. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento variable de cadena sencilla. En algunas alternativas, la molécula específica del tumor se selecciona del grupo que consiste en CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, CE7, EGFR, hB7H3, mesotelina, c-Met, PSMA, Her2, GD-2 y MAGE A3 TCR o combinaciones de las mismas. En algunas alternativas, el espaciador está optimizado para una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia. En algunas alternativas, el segundo promotor es un promotor inducible. En algunas alternativas, el segundo promotor es el promotor constitutivo. En algunas alternativas, la molécula específica del tumor se selecciona del grupo que consiste en CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, CE7, EGFR, hB7H3, mesotelina, c-Met, PSMA, Her2, GD-2 y MAGE A3 TCR o combinaciones de las mismas. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula linfocítica T citotóxica CD8+ seleccionada del grupo que consiste en células T CD8+ no modificadas, células T CD8+ de memoria central, células T CD8+ de memoria efectora y células T CD8+ a granel. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula linfocítica T colaboradora CD4+ que se selecciona del grupo que consiste en células T CD4+ no modificadas, células T CD4+ de memoria central, células T CD4+ de memoria efectora y células T CD4+ a granel. En algunas alternativas, el espaciador está optimizado para una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula T precursora. En algunas alternativas, la célula T precursora es una célula madre hematopoyética.

En algunas alternativas, se proporciona una composición, en la que la composición comprende una célula huésped en un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas alternativas, la célula huésped comprende un sistema. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el dominio de unión al ligando es específico para un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito, un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana, y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular, y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido al ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el fármaco es tamoxifeno y/o sus metabolitos. En algunas alternativas, el primer promotor comprende una secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 41. En algunas alternativas, el segundo promotor es un promotor constitutivo. En algunas alternativas, el segundo promotor es el EFlap. En algunas alternativas, el activador transcripcional comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 40. En algunas alternativas, el primer ácido

nucleico comprende además un primer vector y el segundo ácido nucleico comprende además un segundo vector. En algunas alternativas, ambos vectores se empaquetan en un vector viral. En algunas alternativas, el vector viral es un lentivirus. En algunas alternativas, el primer y segundo ácido nucleico comprenden un vector. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un marcador seleccionable. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica una citocina, un receptor de quimiocinas, un polipéptido que regula la apoptosis o un polipéptido que modula la señalización del punto de control y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido al ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el polipéptido que modula la señalización del punto de control inhibe los reguladores de puntos de control negativos. En algunas alternativas, el regulador de punto de control negativo comprende VISTA, LAG-3 y/o TIM3. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica el receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el espaciador está optimizado para una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia. En algunas alternativas, el primer promotor está en orientación opuesta al segundo promotor. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento de anticuerpo. En algunas alternativas, la molécula específica del tumor se selecciona del grupo que consiste en CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, CE7, EGFR, hB7H3, mesotelina, c-Met, PSMA, Her2, GD-2 y MAGE A3 TCR o combinaciones de las mismas. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica una citocina, un receptor de quimiocinas, un polipéptido que regula la apoptosis o un polipéptido que modula la señalización del punto de control; y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor constitutivo o inducible unido operativamente a un ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el polipéptido que modula la señalización del punto de control inhibe los reguladores de puntos de control negativos. En algunas alternativas, el regulador de punto de control negativo comprende VISTA, LAG-3 y/o TIM3. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica el receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el espaciador está optimizado para una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta a la orientación opuesta al segundo promotor. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento de anticuerpo. En algunas alternativas, la molécula específica del tumor se selecciona del grupo que consiste en CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, CE7, EGFR, hB7H3, mesotelina, c-Met, PSMA, Her2, GD-2 y MAGE A3 TCR o combinaciones de las mismas. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica una citocina, un receptor de quimiocinas, un polipéptido que regula la apoptosis o un polipéptido que modula la señalización del punto de control; y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor constitutivo o inducible unido operativamente a un ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el polipéptido que modula la señalización del punto de control inhibe los reguladores de puntos de control negativos. En algunas alternativas, el regulador de punto de control negativo comprende VISTA, LAG-3 y/o TIM3. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica el receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el espaciador está optimizado para una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana. En algunas alternativas, el primer promotor está en orientación opuesta al segundo promotor. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento de anticuerpo. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento variable de cadena sencilla. En algunas alternativas, la molécula específica del tumor se selecciona del grupo que consiste en CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, CE7, EGFR, hB7H3, mesotelina, c-Met, PSMA, Her2, GD-2 y MAGE A3 TCR o combinaciones de las mismas. En algunas alternativas, el espaciador está optimizado para una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia. En algunas alternativas, el segundo promotor es un promotor inducible. En algunas alternativas, el segundo promotor es el promotor constitutivo. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula linfocítica T citotóxica CD8+ seleccionada del grupo que consiste en células T CD8+ no modificadas, células T CD8+ de memoria central, células T CD8+ de memoria efectora y células T CD8+ a granel. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula linfocítica T colaboradora CD4+ que se selecciona del grupo

que consta en células T CD4+ no modificadas, células T CD4+ de memoria central, células T CD4+ de memoria efectora y células T CD4+ a granel. En algunas alternativas, la composición comprende una célula huésped en la que la célula huésped es una célula linfocítica T citotóxica CD8+ seleccionada del grupo que consiste en células T CD8+ no modificadas, células T CD8+ de memoria central, células T CD8+ de memoria efectora y células T CD8+ a granel y además comprende otra célula huésped en la que la célula huésped es una célula linfocítica T colaboradora CD4+ que se selecciona del grupo que consiste en células T CD4+ no modificadas, células T CD4+ de memoria central, células T CD4+ de memoria efectora y células T CD4+ a granel. En algunas alternativas, la composición comprende una célula huésped en la que la célula huésped es una célula linfocítica T citotóxica CD8+ seleccionada del grupo que consiste en células T CD8+ no modificadas, células T CD8+ de memoria central, células T CD8+ de memoria efectora y células T CD8+ a granel o una célula linfocítica T colaboradora CD4+ que se selecciona del grupo que consiste de células T CD4+ no modificadas, células T CD4+ de memoria central, células T CD4+ de memoria efectora y células T CD4+ a granel y una segunda célula huésped, en la que la segunda célula huésped es una célula T precursora. En algunas alternativas, la célula T precursora es una célula madre hematopoyética.

En algunas alternativas, se proporciona un método *in vitro* para preparar una célula huésped en el que el método comprende a) proporcionar un sistema y b) introducir el sistema en una población de linfocitos T aislada separada y expandir cada población de linfocitos T *in vitro*. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el dominio de unión al ligando es específico para un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana, y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular, y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido al ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el fármaco es tamoxifeno y/o sus metabolitos. En algunas alternativas, el primer promotor comprende una secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 41. En algunas alternativas, el segundo promotor es un promotor constitutivo. En algunas alternativas, el segundo promotor es el EFlap. En algunas alternativas, el activador transcripcional comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 40. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además un primer vector y el segundo ácido nucleico comprende además un segundo vector. En algunas alternativas, ambos vectores se empaquetan en un vector viral. En algunas alternativas, el vector viral es un lentivirus. En algunas alternativas, el primer y segundo ácido nucleico comprenden un vector. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un marcador seleccionable. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica una citocina, un receptor de quimiocinas, un polipéptido que regula la apoptosis o un polipéptido que modula la señalización del punto de control y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido al ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el polipéptido que modula la señalización del punto de control inhibe los reguladores de puntos de control negativos. En algunas alternativas, el regulador de punto de control negativo comprende VISTA, LAG-3 y/o TIM3. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el espaciador está optimizado para una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia. En algunas alternativas, el primer promotor está en orientación opuesta al segundo promotor. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento de anticuerpo. En algunas alternativas, la molécula específica del tumor se selecciona del grupo que consiste en CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, CE7, EGFR, hB7H3, mesotelina, c-Met, PSMA, Her2, GD-2 y MAGE A3 TCR o combinaciones de las mismas. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica una citocina, un receptor de quimiocinas, un polipéptido que regula la apoptosis o un polipéptido que modula la señalización del punto de control; y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor constitutivo o inducible unido operativamente a un ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el polipéptido que modula la señalización del punto de control inhibe los reguladores de puntos de control negativos. En algunas alternativas, el regulador de punto de control negativo comprende VISTA, LAG-3 y/o TIM3. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica el receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el espaciador está optimizado para una mayor proliferación de

células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana. En algunas alternativas, el primer promotor está en orientación opuesta al segundo promotor. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento de anticuerpo. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento variable de cadena sencilla. En algunas alternativas, la molécula específica del tumor se selecciona del grupo que consiste en CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, CE7, EGFR, hB7H3, mesotelina, c-Met, PSMA, Her2, GD-2 y MAGE A3 TCR o combinaciones de las mismas. En algunas alternativas, el espaciador está optimizado para una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia. En algunas alternativas, el segundo promotor es un promotor inducible. En algunas alternativas, el segundo promotor es el promotor constitutivo. En algunas alternativas, en las que los linfocitos T se expanden, el método comprende además cultivar las células en presencia de anti CD3 y/o anti-CD28, y al menos una citocina homeostática hasta que las células se expandan lo suficiente para su uso como infusión celular. En algunas alternativas, el linfocito es CD8+ o CD4+. En algunas alternativas, las células son células T precursoras. En algunas alternativas, las células son células madre hematopoyéticas. En algunas alternativas, la composición comprende una célula huésped en la que la célula huésped es una célula linfocítica T citotóxica CD8+ seleccionada del grupo que consiste en células T CD8+ no modificadas, células T CD8+ de memoria central, células T CD8+ de memoria efectora y células T CD8+ a granel o una célula linfocítica T colaboradora CD4+ que se selecciona del grupo que consiste en células T CD4+ no modificadas, células T CD4+ de memoria central, células T CD4+ de memoria efectora y células T CD4+ a granel y una segunda célula huésped, en la que la segunda célula huésped es una célula T precursora. En algunas alternativas, la célula T precursora es una célula madre hematopoyética.

En algunas alternativas, se proporciona el uso de una célula huésped o una composición en combinación con un fármaco que induce la expresión de un transgén en la célula o composición huésped para el tratamiento del cáncer o una infección viral. En algunas alternativas, la célula huésped comprende un sistema. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el dominio de unión al ligando es específico para un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito, un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana, y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular, y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido al ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el fármaco es tamoxifeno y/o sus metabolitos. En algunas alternativas, el primer promotor comprende una secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 41. En algunas alternativas, el segundo promotor es un promotor constitutivo. En algunas alternativas, el segundo promotor es el EFlap. En algunas alternativas, el activador transcripcional comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 40. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además un primer vector y el segundo ácido nucleico comprende además un segundo vector. En algunas alternativas, ambos vectores se empaquetan en un vector viral. En algunas alternativas, el vector viral es un lentivirus. En algunas alternativas, el primer y segundo ácido nucleico comprenden un vector. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un marcador seleccionable. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica una citocina, un receptor de quimiocinas, un polipéptido que regula la apoptosis o un polipéptido que modula la señalización del punto de control y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido al ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el polipéptido que modula la señalización del punto de control inhibe los reguladores de puntos de control negativos. En algunas alternativas, el regulador de punto de control negativo comprende VISTA, LAG-3 y/o TIM3. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica el receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el espaciador está optimizado para una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia. En algunas alternativas, el primer promotor está en orientación opuesta al segundo promotor. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento de anticuerpo. En algunas alternativas, la molécula específica del tumor se selecciona del grupo que consiste en CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, CE7, EGFR, hB7H3, mesotelina, c-Met, PSMA, Her2, GD-2 y MAGE A3 TCR o combinaciones de las mismas. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica una citocina, un receptor de quimiocinas, un polipéptido que regula la apoptosis o un polipéptido que modula la señalización del punto de control; y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor constitutivo o inducible unido operativamente a un ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el polipéptido que modula la señalización del punto

de control inhibe los reguladores de puntos de control negativos. En algunas alternativas, el regulador de punto de control negativo comprende VISTA, LAG-3 y/o TIM3. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica el receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el espaciador está optimizado para una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana. En algunas alternativas, el primer promotor está en orientación opuesta al segundo promotor. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento de anticuerpo. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento variable de cadena sencilla. En algunas alternativas, la molécula específica del tumor se selecciona del grupo que consiste en CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, CE7, EGFR, hB7H3, mesotelina, c-Met, PSMA, Her2, GD-2 y MAGE A3 TCR o combinaciones de las mismas. En algunas alternativas, el espaciador está optimizado para una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia. En algunas alternativas, el segundo promotor es un promotor inducible. En algunas alternativas, el segundo promotor es el promotor constitutivo. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula linfocítica T citotóxica CD8+ seleccionada del grupo que consiste en células T CD8+ no modificadas, células T CD8+ de memoria central, células T CD8+ de memoria efectora y células T CD8+ a granel. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula linfocítica T colaboradora CD4+ que se selecciona del grupo que consiste en células T CD4+ no modificadas, células T CD4+ de memoria central, células T CD4+ de memoria efectora y células T CD4+ a granel. En algunas alternativas, la composición comprende una célula huésped en un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas alternativas, la célula huésped comprende un sistema. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el dominio de unión al ligando es específico para un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular; y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido al ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el segundo promotor es constitutivo o inducible. En algunas alternativas, el fármaco es el tamoxifeno y/o sus metabolitos. En algunas alternativas, el primer promotor comprende una secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 41. En algunas alternativas, el segundo promotor es un promotor constitutivo. En algunas alternativas, el segundo promotor es el EFlap. En algunas alternativas, el activador transcripcional comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 40. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además un primer vector y el segundo ácido nucleico comprende además un segundo vector. En algunas alternativas, ambos vectores se empaquetan en un vector viral. En algunas alternativas, el vector viral es un lentivirus. En algunas alternativas, el primer y segundo ácido nucleico comprenden un vector. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un marcador seleccionable. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica el receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el dominio de unión al ligando es específico para un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el primer promotor está en orientación opuesta al segundo promotor. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento de anticuerpo. En algunas alternativas, la molécula específica del tumor se selecciona del grupo que consiste en CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, CE7, EGFR, hB7H3, mesotelina, c-Met, PSMA, Her2, GD-2 y MAGE A3 TCR o combinaciones de las mismas. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica una citocina, un receptor de quimiocinas, un polipéptido que regula la apoptosis o un polipéptido que modula la señalización del punto de control; y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido al ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el segundo promotor es constitutivo o inducible. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica el receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el dominio de unión al ligando es específico para un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el primer promotor está en orientación opuesta al segundo promotor. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento de anticuerpo. En algunas alternativas, el dominio de

unión al ligando es un fragmento variable de cadena sencilla. En algunas alternativas, la molécula específica del tumor se selecciona del grupo que consiste en CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, CE7, EGFR, hB7H3, mesotelina, c-Met, PSMA, Her2, GD-2 y MAGE A3 TCR o combinaciones de las mismas. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula T precursora. En algunas alternativas, la célula T precursora es una célula madre hematopoyética. En algunas alternativas, la población de linfocitos T aislados comprende células T precursoras. En algunas alternativas, las células T precursoras son células madre hematopoyéticas. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula linfocítica T citotóxica CD8+ seleccionada del grupo que consiste en células T CD8+ no modificadas, células T CD8+ de memoria central, células T CD8+ de memoria efectora y células T CD8+ a granel. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula linfocítica T colaboradora CD4+ que se selecciona del grupo que consiste en células T CD4+ no modificadas, células T CD4+ de memoria central, células T CD4+ de memoria efectora y células T CD4+ a granel. En algunas alternativas, la composición comprende una célula huésped en la que la célula huésped es una célula linfocítica T citotóxica CD8+ seleccionada del grupo que consiste en células T CD8+ no modificadas, células T CD8+ de memoria central, células T CD8+ de memoria efectora y células T CD8+ a granel y otra célula huésped en la que la célula huésped es una célula linfocítica T colaboradora CD4+ que se selecciona del grupo que consiste en células T CD4+ no modificadas, células T CD4+ de memoria central, células T CD4+ de memoria efectora y células T CD4+ a granel. En algunas alternativas, el cáncer es un tumor sólido o una neoplasia maligna hematológica. En algunas alternativas, el tumor sólido se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de cerebro, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer de próstata y cáncer de ovario. En algunas alternativas, la composición comprende una célula huésped en la que la célula huésped es una célula linfocítica T citotóxica CD8+ seleccionada del grupo que consiste en células T CD8+ no modificadas, células T CD8+ de memoria central, células T CD8+ de memoria efectora y células T CD8+ a granel o una célula linfocítica T colaboradora CD4+ que se selecciona del grupo que consiste en células T CD4+ no modificadas, células T CD4+ de memoria central, células T CD4+ de memoria efectora y células T CD4+ a granel y una segunda célula huésped, en la que la segunda célula huésped es una célula T precursora. En algunas alternativas, la célula T precursora es una célula madre hematopoyética.

En algunas alternativas, se proporciona un método para realizar inmunoterapia celular en un sujeto que tiene cáncer o una infección viral en el que el método comprende administrar una composición o una célula huésped al sujeto y administrar un fármaco que induce la expresión de un transgén en la composición o las células huésped. En algunas alternativas, la célula huésped comprende un sistema. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el dominio de unión al ligando es específico para un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito, un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana, y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular, y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido al ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el fármaco es tamoxifeno y/o sus metabolitos. En algunas alternativas, el primer promotor comprende una secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 41. En algunas alternativas, el segundo promotor es un promotor constitutivo. En algunas alternativas, el segundo promotor es el EFlap. En algunas alternativas, el activador transcripcional comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 40. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además un primer vector y el segundo ácido nucleico comprende además un segundo vector. En algunas alternativas, ambos vectores se empaquetan en un vector viral. En algunas alternativas, el vector viral es un lentivirus. En algunas alternativas, el primer y segundo ácido nucleico comprenden un vector. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un marcador seleccionable. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica una citocina, un receptor de quimiocinas, un polipéptido que regula la apoptosis o un polipéptido que modula la señalización del punto de control y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido al ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el polipéptido que modula la señalización del punto de control inhibe los reguladores de puntos de control negativos. En algunas alternativas, el regulador de punto de control negativo comprende VISTA, LAG-3 y/o TIM3. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica el receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el espaciador está optimizado para una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia. En algunas alternativas, el primer promotor está en orientación opuesta al segundo promotor. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento de anticuerpo. En algunas alternativas, la molécula específica del tumor se selecciona del grupo que consiste en CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, CE7, EGFR, hB7H3, mesotelina, c-Met, PSMA, Her2, GD-2 y MAGE A3 TCR o combinaciones de las mismas. En algunas alternativas, el

sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica una citocina, un receptor de quimiocinas, un polipéptido que regula la apoptosis o un polipéptido que modula la señalización del punto de control; y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor constitutivo o inducible unido operativamente a un ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el polipéptido que modula la señalización del punto de control inhibe los reguladores de puntos de control negativos. En algunas alternativas, el regulador de punto de control negativo comprende VISTA, LAG-3 y/o TIM3. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica el receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el espaciador está optimizado para una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana. En algunas alternativas, el primer promotor está en orientación opuesta al segundo promotor. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento de anticuerpo. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento variable de cadena sencilla. En algunas alternativas, la molécula específica del tumor se selecciona del grupo que consiste en CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, CE7, EGFR, hB7H3, mesotelina, c-Met, PSMA, Her2, GD-2 y MAGE A3 TCR o combinaciones de las mismas. En algunas alternativas, el espaciador está optimizado para una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia. En algunas alternativas, el segundo promotor es un promotor inducible. En algunas alternativas, el segundo promotor es el promotor constitutivo. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula T precursora. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula madre hematopoyética. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula linfocítica T citotóxica CD8+ seleccionada del grupo que consiste en células T CD8+ no modificadas, células T CD8+ de memoria central, células T CD8+ de memoria efectora y células T CD8+ a granel. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula linfocítica T colaboradora CD4+ que se selecciona del grupo que consiste en células T CD4+ no modificadas, células T CD4+ de memoria central, células T CD4+ de memoria efectora y células T CD4+ a granel. En algunas alternativas, la composición comprende una célula huésped en un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas alternativas, la célula huésped comprende un sistema. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el dominio de unión al ligando es específico para un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular; y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido al ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el segundo promotor es constitutivo o inducible. En algunas alternativas, el fármaco es el tamoxifeno y/o sus metabolitos. En algunas alternativas, el primer promotor comprende una secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 41. En algunas alternativas, el segundo promotor es un promotor constitutivo. En algunas alternativas, el segundo promotor es el EFlap. En algunas alternativas, el activador transcripcional comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 40. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además un primer vector y el segundo ácido nucleico comprende además un segundo vector. En algunas alternativas, ambos vectores se empaquetan en un vector viral. En algunas alternativas, el vector viral es un lentivirus. En algunas alternativas, el primer y segundo ácido nucleico comprenden un vector. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un marcador seleccionable. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica el receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el dominio de unión al ligando es específico para un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el primer promotor está en orientación opuesta al segundo promotor. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento de anticuerpo. En algunas alternativas, la molécula específica del tumor se selecciona del grupo que consiste en CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, CE7, EGFR, hB7H3, mesotelina, c-Met, PSMA, Her2, GD-2 y MAGE A3 TCR o combinaciones de las mismas. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco, en el que el primer ácido nucleico está operativamente unido a un polinucleótido que codifica una citocina, un receptor de quimiocinas, un polipéptido que regula la apoptosis o un polipéptido que modula la señalización del punto de control; y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido al ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el promotor inducible. En algunas alternativas, el segundo promotor es constitutivo o inducible. En algunas alternativas, el polipéptido que modula la señalización del punto de control inhibe los reguladores de puntos de control negativos. En algunas alternativas, el regulador de punto de control negativo

comprende VISTA, LAG-3 y/o TIM3. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica el receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, molécula viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador está optimizado; un polinucleótido que codifica un dominio transmembrana; y d) un polinucleótido que codifica un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el primer promotor está en orientación opuesta al segundo promotor. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento de anticuerpo. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento variable de cadena sencilla. En algunas alternativas, la molécula específica del tumor se selecciona del grupo que consiste en CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, CE7, EGFR, hB7H3, mesotelina, c-Met, PSMA, Her2, GD-2 y MAGE A3 TCR o combinaciones de las mismas. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula T precursora. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula madre hematopoyética. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula linfocítica T citotóxica CD8+ seleccionada del grupo que consiste en células T CD8+ no modificadas, células T CD8+ de memoria central, células T CD8+ de memoria efectora y células T CD8+ a granel. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula linfocítica T colaboradora CD4+ que se selecciona del grupo que consiste en células T CD4+ no modificadas, células T CD4+ de memoria central, células T CD4+ de memoria efectora y células T CD4+ a granel. En algunas alternativas, la composición comprende una célula huésped en la que la célula huésped es una célula linfocítica T citotóxica CD8+ seleccionada del grupo que consiste en células T CD8+ no modificadas, células T CD8+ de memoria central, células T CD8+ de memoria efectora y células T CD8+ a granel y otra célula huésped en la que la célula huésped es una célula linfocítica T colaboradora CD4+ que se selecciona del grupo que consiste en células T CD4+ no modificadas, células T CD4+ de memoria central, células T CD4+ de memoria efectora y células T CD4+ a granel. En algunas alternativas, el cáncer se selecciona entre un tumor sólido o una neoplasia maligna hematológica. En algunas alternativas, el tumor sólido se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de cerebro, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer de próstata y cáncer de ovario. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula T precursora. En algunas alternativas, la célula T precursora es una célula madre hematopoyética. En algunas alternativas, la población de linfocitos T aislados comprende células T precursoras. En algunas alternativas, las células T precursoras son células madre hematopoyéticas. En algunas alternativas, la composición comprende una célula huésped en la que la célula huésped es una célula linfocítica T citotóxica CD8+ seleccionada del grupo que consiste en células T CD8+ no modificadas, células T CD8+ de memoria central, células T CD8+ de memoria efectora y células T CD8+ a granel o una célula linfocítica T colaboradora CD4+ que se selecciona del grupo que consiste en células T CD4+ no modificadas, células T CD4+ de memoria central, células T CD4+ de memoria efectora y células T CD4+ a granel y una segunda célula huésped, en la que la segunda célula huésped es una célula T precursora. En algunas alternativas, la célula T precursora es una célula madre hematopoyética.

Más alternativas

En algunas alternativas, se proporciona un sistema para la expresión inducible de un receptor de antígeno quimérico, en el que el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor, que es un promotor inducible, unido operativamente a un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido a un polinucleótido que codifica un activador transcripcional, que es capaz de activar la transcripción del primer promotor en presencia de un fármaco o metabolito del mismo. En algunas alternativas, se proporciona un sistema para la expresión inducible, en el que el sistema comprende a) un promotor inducible, b) un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico y c) un polinucleótido que codifica un activador transcripcional, cuyo activador transcripcional es capaz de activar la transcripción del promotor inducible en presencia de un fármaco o metabolito del mismo. En algunas alternativas, el polinucleótido que codifica el receptor quimérico está operativamente unido al promotor inducible. En algunas alternativas, el sistema comprende además un polinucleótido que codifica una proteína recombinante, polinucleótido que está operativamente unido al promotor inducible. En algunas alternativas, el fármaco o metabolito del mismo comprende: (i) un fármaco tolerado cuando se administra a un sujeto humano diaria o semanalmente, o un metabolito del mismo; (ii) una molécula que se une específicamente a un receptor humano, opcionalmente al receptor de estrógeno, o un metabolito del mismo; y/o (iii) tamoxifeno y/o un metabolito o análogo del tamoxifeno. En algunas alternativas, el activador transcripcional comprende: (a) un dominio de unión al ADN; (b) un dominio de unión al ligando que se une específicamente al fármaco o metabolito del mismo; y (c) un dominio de transactivación, opcionalmente enlazado y/o fusionado en ese orden. En algunas alternativas del sistema, (a) el dominio de unión al ADN comprende sitios de unión al ADN no presentes en una proteína expresada naturalmente en un linfocito o no presentes en una proteína expresada naturalmente en una célula T; y/o (b) el fármaco o metabolito es la molécula que se une específicamente al receptor humano, opcionalmente al receptor de estrógeno, o al metabolito del mismo, y la unión entre el fármaco o metabolito y el dominio de unión al ligando es selectiva para el dominio de unión al ligando sobre el receptor humano, por lo que la unión del dominio de unión al ligando al fármaco o metabolito es mayor, opcionalmente al menos 1,5, 2, 3 o 4 veces más fuerte que la unión del receptor humano; y/o (c) el dominio de transactivación comprende un dominio de transactivación de p65 o una variante funcional del mismo; y/o (d) el primer promotor comprende uno o más sitios de unión para el dominio de unión al ADN. En algunas alternativas, el primer promotor no comprende otro sitio de unión para ningún dominio de unión al ADN humano que no sea un dominio o dominios de unión a ADN presentes en el activador transcripcional; y/o en el que el primer promotor es un promotor

quimérico sintético y/o el activador transcripcional es un activador transcripcional quimérico sintético; y/o en el que el dominio de unión al ADN comprende un dominio de unión al ADN presente en un factor nuclear de hepatocito, que es opcionalmente HNF1-alfa o HNF1-beta. En algunas alternativas del sistema, el primer promotor comprende la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 41. En algunas alternativas, el segundo promotor es un promotor constitutivo. En algunas alternativas, el segundo promotor es o comprende un promotor de EF1 α o una parte funcional del mismo. En algunas alternativas, el activador transcripcional comprende un polipéptido que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 40. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico está comprendido dentro de un primer vector, que además está comprendido por el sistema y el segundo ácido nucleico está comprendido dentro de un segundo vector, que además está comprendido por el sistema. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico o el primer promotor, el polinucleótido que codifica el receptor del antígeno quimérico, el segundo promotor y el polinucleótido que codifica el transactivador, están comprendidos dentro de un vector, que además está comprendido por el sistema. En algunas alternativas del sistema, el sistema está compuesto por un único vector de empaquetamiento viral. En algunas alternativas, el vector viral es un vector lentiviral. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un marcador seleccionable o en el que el sistema comprende además un marcador seleccionable unido operativamente al primer promotor. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable o en el que el sistema comprende además un marcador seleccionable unido operativamente al segundo promotor.

En algunas alternativas, se proporciona un sistema para la expresión inducible, en el que el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor, que es un promotor inducible y está operativamente unido a un polinucleótido que codifica una citocina, un receptor de quimiocina, un polipéptido que inhibe la apoptosis, o un polipéptido que inhibe la señalización del punto de control negativo y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor, que es un promotor constitutivo o inducible, unido operativamente a un polinucleótido que codifica un activador transcripcional capaz de inducir la transcripción del primer promotor en presencia de un fármaco o metabolito o análogo del mismo. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno recombinante, que opcionalmente es un receptor de antígeno quimérico. En algunas alternativas, el receptor de antígeno quimérico comprende a) un dominio de unión al ligando, que se une a un ligando que es opcionalmente una molécula específica del 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, b) un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador opcionalmente proporciona una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia, c) un dominio transmembrana y d) un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el primer promotor está en orientación opuesta al segundo promotor. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento de anticuerpo. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento variable de cadena sencilla. En algunas alternativas, la molécula específica del tumor se selecciona del grupo que consiste en CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, CE7, EGFR, hB7H3, mesotelina, c-Met, PSMA, Her2, GD-2, MAGE A3 TCR y combinaciones de las mismas.

En algunas alternativas, se proporciona un polipéptido receptor quimérico codificado por el sistema. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor, que es un promotor inducible, operativamente unido a un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido a un polinucleótido que codifica un activador transcripcional, que es capaz de activar la transcripción del primer promotor en presencia de un fármaco o metabolito del mismo. En algunas alternativas, se proporciona un sistema para la expresión inducible, en el que el sistema comprende a) un promotor inducible, b) un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico y c) un polinucleótido que codifica un activador transcripcional, cuyo activador transcripcional es capaz de activar la transcripción del promotor inducible en presencia de un fármaco o metabolito del mismo. En algunas alternativas, el polinucleótido que codifica el receptor quimérico está operativamente unido al promotor inducible. En algunas alternativas, el sistema comprende además un polinucleótido que codifica una proteína recombinante, polinucleótido que está operativamente unido al promotor inducible. En algunas alternativas, el fármaco o metabolito del mismo comprende: (i) un fármaco tolerado cuando se administra a un sujeto humano diaria o semanalmente, o un metabolito del mismo; (ii) una molécula que se une específicamente a un receptor humano, opcionalmente al receptor de estrógeno, o un metabolito del mismo; y/o (iii) tamoxifeno y/o un metabolito o análogo de tamoxifeno. En algunas alternativas, el activador transcripcional comprende: (a) un dominio de unión al ADN; (b) un dominio de unión al ligando que se une específicamente al fármaco o metabolito del mismo; y (c) un dominio de transactivación, opcionalmente enlazado y/o fusionado en ese orden. En algunas alternativas del sistema, (a) el dominio de unión al ADN comprende sitios de unión al ADN no presentes en una proteína expresada naturalmente en un linfocito o no presentes en una proteína expresada naturalmente en una célula T; y/o (b) el fármaco o metabolito es la molécula que se une específicamente al receptor humano, opcionalmente al receptor de estrógeno, o al metabolito del mismo, y la unión entre el fármaco o metabolito y el dominio de unión al ligando es selectiva para el dominio de unión al ligando sobre el receptor humano, por lo que la unión del dominio de unión al ligando al fármaco o metabolito es mayor, opcionalmente al menos 1,5, 2, 3 o 4 veces más fuerte que la unión del receptor humano; y/o (c) el dominio de transactivación comprende un dominio de transactivación p65 o una variante funcional del mismo; y/o (d) el primer promotor comprende uno o más sitios de unión para el dominio de unión al ADN. En algunas alternativas, el primer promotor no comprende otro sitio de unión para ningún dominio de unión al ADN humano que no sea un dominio o dominios de unión a ADN presentes en el activador transcripcional; y/o en el que el primer promotor es un promotor

químérico sintético y/o el activador transcripcional es un activador transcripcional químérico sintético; y/o en el que el dominio de unión al ADN comprende un dominio de unión al ADN presente en un factor nuclear de hepatocito, que es opcionalmente HNF1-alfa o HNF1-beta. El sistema de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el primer promotor comprende la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 41. En algunas alternativas, el segundo promotor es un promotor constitutivo. En algunas alternativas, el segundo promotor es o comprende un promotor de EF1 α o una parte funcional del mismo. En algunas alternativas, el activador transcripcional comprende un polipéptido que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 40. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico está comprendido dentro de un primer vector, que además está comprendido por el sistema y el segundo ácido nucleico está comprendido dentro de un segundo vector, que además está comprendido por el sistema. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico o el primer promotor, el polinucleótido que codifica el receptor del antígeno químérico, el segundo promotor y el polinucleótido que codifica el transactivador, están comprendidos dentro de un vector, que además está comprendido por el sistema. En algunas alternativas del sistema, el sistema está compuesto por un único vector de empaquetamiento viral. En algunas alternativas, el vector viral es un vector lentiviral. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un marcador seleccionable o en el que el sistema comprende además un marcador seleccionable unido operativamente al primer promotor. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable o en el que el sistema comprende además un marcador seleccionable unido operativamente al segundo promotor. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor, que es un promotor inducible y está operativamente unido a un polinucleótido que codifica una citocina, un receptor de quimiocinas, un polipéptido que inhibe la apoptosis o un polipéptido que inhibe la señalización del punto de control negativo y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor, que es un promotor constitutivo o inducible, unido operativamente a un polinucleótido que codifica un activador transcripcional capaz de inducir la transcripción del primer promotor en presencia de un fármaco o metabolito o análogo del mismo. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno recombinante, que opcionalmente es un receptor de antígeno químérico. En algunas alternativas, el receptor de antígeno químérico comprende un a) dominio de unión al ligando, que se une a un ligando que es opcionalmente una molécula específica del 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, b) un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador opcionalmente proporciona una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor químérico de referencia, c) un dominio transmembrana y d) un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el primer promotor está en orientación opuesta al segundo promotor. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento de anticuerpo. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento variable de cadena sencilla. En algunas alternativas, la molécula específica del tumor se selecciona del grupo que consiste en CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, CE7, EGFR, hB7H3, mesotelina, c-Met, PSMA, Her2, GD-2 y MAGE A3 TCR y combinaciones de las mismas.

En algunas alternativas, se proporciona una célula huésped que comprende un sistema o vector de empaquetamiento viral. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor, que es un promotor inducible, operativamente unido a un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno químérico y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido a un polinucleótido que codifica un activador transcripcional, que es capaz de activar la transcripción del primer promotor en presencia de un fármaco o metabolito del mismo. En algunas alternativas, se proporciona un sistema para la expresión inducible, en el que el sistema comprende a) un promotor inducible, b) un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno químérico y c) un polinucleótido que codifica un activador transcripcional, cuyo activador transcripcional es capaz de activar la transcripción del promotor inducible en presencia de un fármaco o metabolito del mismo. En algunas alternativas, el polinucleótido que codifica el receptor químérico está operativamente unido al promotor inducible. En algunas alternativas, el sistema comprende además un polinucleótido que codifica una proteína recombinante, cuyo polinucleótido está operativamente unido al promotor inducible. En algunas alternativas, el fármaco o metabolito del mismo comprende: (i) un fármaco tolerado cuando se administra a un sujeto humano diaria o semanalmente, o un metabolito del mismo; (ii) una molécula que se une específicamente a un receptor humano, opcionalmente al receptor de estrógeno, o un metabolito del mismo; y/o (iii) tamoxifeno y/o un metabolito o análogo del tamoxifeno. En algunas alternativas, el activador transcripcional comprende: (a) un dominio de unión al ADN; (b) un dominio de unión al ligando que se une específicamente al fármaco o metabolito del mismo; y (c) un dominio de transactivación, opcionalmente enlazado y/o fusionado en ese orden. En algunas alternativas del sistema, (a) el dominio de unión al ADN comprende sitios de unión al ADN no presentes en una proteína expresada naturalmente en un linfocito o no presentes en una proteína expresada naturalmente en una célula T; y/o (b) el fármaco o metabolito es la molécula que se une específicamente al receptor humano, opcionalmente al receptor de estrógeno, o al metabolito del mismo, y la unión entre el fármaco o metabolito y el dominio de unión al ligando es selectiva para el dominio de unión al ligando sobre el receptor humano, por lo que la unión por el dominio de unión al ligando al fármaco o metabolito es mayor, opcionalmente al menos 1,5, 2, 3 o 4 veces más fuerte que la unión del receptor humano; y/o (c) el dominio de transactivación comprende un dominio de transactivación p65 o una variante funcional del mismo; y/o (d) el primer promotor comprende uno o más sitios de unión para el dominio de unión al ADN. En algunas alternativas, el primer promotor no comprende otro sitio de unión para ningún dominio de unión al ADN humano que no sea un dominio o dominios de unión a ADN presentes en el activador transcripcional; y/o en el que el primer promotor es un promotor químérico sintético y/o el activador transcripcional es un activador transcripcional químérico sintético; y/o en el que el dominio de unión al ADN comprende un dominio de unión al ADN presente en un factor nuclear de hepatocito, que es

opcionalmente HNF1-alfa o HNF1-beta. En algunas alternativas, el primer promotor comprende la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 41. En algunas alternativas, el segundo promotor es un promotor constitutivo. En algunas alternativas, el segundo promotor es o comprende un promotor de EF1 α o una parte funcional del mismo. En algunas alternativas, el activador transcripcional comprende un polipéptido que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 40.

5 En algunas alternativas, el primer ácido nucleico está comprendido dentro de un primer vector, que además está comprendido por el sistema y el segundo ácido nucleico está comprendido dentro de un segundo vector, que además está comprendido por el sistema. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico o el primer promotor, el polinucleótido que codifica el receptor del antígeno quimérico, el segundo promotor y el polinucleótido que codifica el transactivador, están comprendidos dentro de un vector, que además está comprendido

10 por el sistema. En algunas alternativas, el sistema descrito anteriormente está comprendido en un único vector de empaquetamiento viral. En algunas de estas alternativas, el vector viral es un vector lentiviral. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un marcador seleccionable o en el que el sistema comprende además un marcador seleccionable unido operativamente al primer promotor. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un ácido nucleico que codifica un

15 marcador seleccionable o en el que el sistema comprende además un marcador seleccionable unido operativamente al segundo promotor. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor, que es un promotor inducible y está operativamente unido a un polinucleótido que codifica una citocina, un receptor de quimiocinas, un polipéptido que inhibe la apoptosis o un polipéptido que inhibe la señalización de punto de control negativa y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor, que es un promotor

20 constitutivo o inducible, unido operativamente a un polinucleótido que codifica un activador transcripcional capaz de inducir la transcripción del primer promotor en presencia de un fármaco o metabolito o análogo del mismo. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno recombinante, que opcionalmente es un receptor de antígeno quimérico. En algunas alternativas, el receptor de antígeno quimérico comprende un a) dominio de unión al ligando, que se une a un ligando que es opcionalmente una

25 molécula específica del 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, b) un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador opcionalmente proporciona una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia, c) un dominio transmembrana y d) un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el primer promotor está en orientación opuesta al segundo promotor. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento de anticuerpo. En algunas

30 alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento variable de cadena sencilla. En algunas alternativas, la molécula específica del tumor se selecciona del grupo que consiste en CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, CE7, EGFR, hB7H3, mesotelina, c-Met, PSMA, Her2, GD-2 y MAGE A3 TCR y combinaciones de las mismas.

35 En algunas alternativas, se proporciona una célula huésped, en la que la célula huésped es un linfocito humano primario, en el que la célula huésped comprende a) un ácido nucleico que comprende un primer promotor, que es un promotor sintético inducible que contiene un sitio de unión para un dominio de unión al ADN que no está presente de forma natural en el linfocito humano primario y b) un polinucleótido que codifica un activador transcripcional, comprendiendo el activador transcripcional i) el dominio de unión al ADN, en el que el dominio de unión al ADN no se

40 une específicamente a una secuencia de ADN presente naturalmente en el linfocito humano primario; ii) un dominio que se une específicamente a un fármaco o metabolito del mismo y no se une o no se une con un grado de afinidad tan grande a ninguna molécula presente de forma natural en el linfocito humano primario y iii) un dominio de transactivación, en el que el activador transcripcional es capaz de inducir la transcripción del primer promotor en presencia del fármaco o metabolito del mismo y/o tras la unión del fármaco o metabolito del mismo al dominio en (ii).

45 En algunas alternativas, la célula comprende además un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico, que opcionalmente está unido operativamente al primer promotor. En algunas alternativas, la célula comprende además un segundo promotor, que está operativamente unido al polinucleótido que codifica el activador transcripcional, en el que el segundo promotor es opcionalmente constitutivo. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula linfocítica T citotóxica CD8⁺ seleccionada del grupo que consiste en células T CD8⁺ no

50 modificadas, células T CD8⁺ de memoria central, células T CD8⁺ de memoria efectora y células T CD8⁺ a granel. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula linfocítica T colaboradora CD4⁺ que se selecciona del grupo que consiste en células T CD4⁺ no modificadas, células T CD4⁺ de memoria central, células T CD4⁺ de memoria efectora y células T CD4⁺ a granel. En algunas alternativas, se proporciona una composición, en la que la composición comprende una célula huésped en un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas alternativas, la célula

55 huésped es un linfocito humano primario, en el que la célula huésped comprende a) un ácido nucleico que comprende un primer promotor, que es un promotor sintético inducible que contiene un sitio de unión para un dominio de unión al ADN que no está presente de forma natural en el linfocito humano primario y b) un polinucleótido que codifica un activador transcripcional, comprendiendo el activador transcripcional i) el dominio de unión al ADN, en el que el dominio de unión al ADN no se une específicamente a una secuencia de ADN presente naturalmente en el linfocito humano

60 primario; ii) un dominio que se une específicamente a un fármaco o metabolito del mismo y no se une o no se une con un grado de afinidad tan grande a ninguna molécula presente de forma natural en el linfocito humano primario y iii) un dominio de transactivación, en el que el activador transcripcional es capaz de inducir la transcripción del primer promotor en presencia del fármaco o metabolito del mismo y/o tras la unión del fármaco o metabolito del mismo al dominio en (ii). En algunas alternativas, la célula comprende además un polinucleótido que codifica un receptor de

65 antígeno quimérico, que opcionalmente está unido operativamente al primer promotor. En algunas alternativas, la célula comprende además un segundo promotor, que está operativamente unido al polinucleótido que codifica el

activador transcripcional, en el que el segundo promotor es opcionalmente constitutivo. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula linfocítica T citotóxica CD8+ seleccionada del grupo que consiste en células T CD8+ no modificadas, células T CD8+ de memoria central, células T CD8+ de memoria efectora y células T CD8+ a granel. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula linfocítica T colaboradora CD4+ que se selecciona del grupo que consiste en células T CD4+ no modificadas, células T CD4+ de memoria central, células T CD4+ de memoria efectora y células T CD4+ a granel. En algunas alternativas, la composición comprende un linfocito citotóxico T CD8+ seleccionado del grupo que consiste en células T CD8+ no modificadas, células T CD8+ de memoria central, células T CD8+ de memoria efectora y células T CD8+ a granel y una célula linfocítica T colaboradora CD4+ que se selecciona del grupo que consiste en células T CD4+ no modificadas, células T CD4+ de memoria central, células T CD4+ de memoria efectora y células T CD4+ a granel.

En algunas alternativas, se proporciona un método *in vitro* para preparar una célula huésped y comprende introducir un sistema en una población de linfocitos T aislada separada y expandir cada población de linfocitos T *in vitro*. En algunas alternativas, la célula huésped es un linfocito humano primario, en el que la célula huésped comprende a) un ácido nucleico que comprende un primer promotor, que es un promotor sintético inducible que contiene un sitio de unión para un dominio de unión al ADN que no está presente de forma natural en el linfocito humano primario y b) un polinucleótido que codifica un activador transcripcional, comprendiendo el activador transcripcional i) el dominio de unión al ADN, en el que el dominio de unión al ADN no se une específicamente a una secuencia de ADN presente naturalmente en el linfocito humano primario; ii) un dominio que se une específicamente a un fármaco o metabolito del mismo y no se une o no se une con un grado de afinidad tan grande a ninguna molécula presente de forma natural en el linfocito humano primario y iii) un dominio de transactivación, en el que el activador transcripcional es capaz de inducir la transcripción del primer promotor en presencia del fármaco o metabolito del mismo y/o tras la unión del fármaco o metabolito del mismo al dominio en (ii). En algunas alternativas, la célula comprende además un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico, que opcionalmente está unido operativamente al primer promotor. En algunas alternativas, la célula comprende además un segundo promotor, que está operativamente unido al polinucleótido que codifica el activador transcripcional, en el que el segundo promotor es opcionalmente constitutivo. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula linfocítica T citotóxica CD8+ seleccionada del grupo que consiste en células T CD8+ no modificadas, células T CD8+ de memoria central, células T CD8+ de memoria efectora y células T CD8+ a granel. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula linfocítica T colaboradora CD4+ que se selecciona del grupo que consiste en células T CD4+ no modificadas, células T CD4+ de memoria central, células T CD4+ de memoria efectora y células T CD4+ a granel. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor, que es un promotor inducible, operativamente unido a un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor operativamente unido a un polinucleótido que codifica un activador transcripcional, que es capaz de activar la transcripción del primer promotor en presencia de un fármaco o metabolito del mismo. En algunas alternativas, se proporciona un sistema para la expresión inducible, en el que el sistema comprende a) un promotor inducible, b) un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico y c) un polinucleótido que codifica un activador transcripcional, cuyo activador transcripcional es capaz de activar la transcripción del promotor inducible en presencia de un fármaco o metabolito del mismo. En algunas alternativas, el polinucleótido que codifica el receptor quimérico está operativamente unido al promotor inducible. En algunas alternativas, el sistema comprende además un polinucleótido que codifica una proteína recombinante, polinucleótido que está operativamente unido al promotor inducible. En algunas alternativas, el fármaco o metabolito del mismo comprende: (i) un fármaco tolerado cuando se administra a un sujeto humano diaria o semanalmente, o un metabolito del mismo; (ii) una molécula que se une específicamente a un receptor humano, opcionalmente al receptor de estrógeno, o un metabolito del mismo; y/o (iii) tamoxifeno y/o un metabolito o análogo del tamoxifeno. En algunas alternativas, el activador transcripcional comprende: (a) un dominio de unión al ADN; (b) un dominio de unión al ligando que se une específicamente al fármaco o metabolito del mismo; y (c) un dominio de transactivación, opcionalmente enlazado y/o fusionado en ese orden. En algunas alternativas del sistema, (a) el dominio de unión al ADN comprende sitios de unión al ADN no presentes en una proteína expresada naturalmente en un linfocito o no presentes en una proteína expresada naturalmente en una célula T; y/o (b) el fármaco o metabolito es la molécula que se une específicamente al receptor humano, opcionalmente al receptor de estrógeno, o al metabolito del mismo, y la unión entre el fármaco o metabolito y el dominio de unión al ligando es selectivo para el dominio de unión al ligando sobre el receptor humano, por lo que la unión del dominio de unión al ligando al fármaco o metabolito es mayor, opcionalmente al menos 1,5, 2, 3 o 4 veces más fuerte que la unión al receptor humano; y/o (c) el dominio de transactivación comprende un dominio de transactivación p65 o una variante funcional del mismo; y/o (d) el primer promotor comprende uno o más sitios de unión para el dominio de unión al ADN. En algunas alternativas, el primer promotor no comprende otro sitio de unión para ningún dominio de unión al ADN humano que no sea un dominio o dominios de unión a ADN presentes en el activador transcripcional; y/o en el que el primer promotor es un promotor quimérico sintético y/o el activador transcripcional es un activador transcripcional quimérico sintético; y/o en el que el dominio de unión al ADN comprende un dominio de unión al ADN presente en un factor nuclear de hepatocito, que es opcionalmente HNF1-alfa o HNF1-beta. En algunas alternativas, el primer promotor comprende la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 41. En algunas alternativas, el segundo promotor es un promotor constitutivo. En algunas alternativas, el segundo promotor es o comprende un promotor de EF1 α o una parte funcional del mismo. En algunas alternativas, el activador transcripcional comprende un polipéptido que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 40. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico está comprendido dentro de un primer vector, que además está comprendido por el sistema y el segundo ácido nucleico está comprendido dentro de un segundo vector, que además está comprendido por el sistema. En algunas alternativas, el primer ácido

nucleico y el segundo ácido nucleico o el primer promotor, el polinucleótido que codifica el receptor del antígeno quimérico, el segundo promotor y el polinucleótido que codifica el transactivador, están comprendidos dentro de un vector, que además está comprendido por el sistema. En algunas alternativas, el sistema está comprendido en un único vector de empaquetamiento viral. En algunas alternativas, el vector viral es un vector lentiviral. En algunas alternativas, el primer ácido nucleico comprende además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un marcador seleccionable o en el que el sistema comprende además un marcador seleccionable unido operativamente al primer promotor. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable o en el que el sistema comprende además un marcador seleccionable unido operativamente al segundo promotor. En algunas alternativas, el sistema comprende a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor, que es un promotor inducible y está operativamente unido a un polinucleótido que codifica una citocina, un receptor de quimiocinas, un polipéptido que inhibe la apoptosis o un polipéptido que inhibe la señalización del punto de control negativo y b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor, que es un promotor constitutivo o inducible, unido operativamente a un polinucleótido que codifica un activador transcripcional capaz de inducir la transcripción del primer promotor en presencia de un fármaco o metabolito o análogo del mismo. En algunas alternativas, el segundo ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno recombinante, que opcionalmente es un receptor de antígeno quimérico. En algunas alternativas, el receptor de antígeno quimérico comprende un a) dominio de unión al ligando, que se une a un ligando que es opcionalmente una molécula específica del 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, b) un espaciador polipeptídico, en el que el espaciador opcionalmente proporciona una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia, c) un dominio transmembrana y d) un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el primer promotor está en orientación opuesta al segundo promotor. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento de anticuerpo. En algunas alternativas, el dominio de unión al ligando es un fragmento variable de cadena sencilla. En algunas alternativas, la molécula específica del tumor se selecciona del grupo que consiste en CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, CE7, EGFR, hB7H3, mesotelina, c-Met, PSMA, Her2, GD-2, MAGE A3 TCR y combinaciones de las mismas. En algunas alternativas, los linfocitos T de la población se expanden y en las que el método comprende además cultivar las células en presencia de anti-CD3 y/o anti-CD28, y al menos una citocina homeostática hasta que las células se expandan lo suficiente para su uso como una infusión celular. En algunas alternativas, se puede realizar el cultivo en presencia de anti-CD3 y/o anti-CD28, y al menos una citocina homeostática antes o después de la introducción del sistema.

En algunas alternativas, se proporciona un uso de la célula huésped o una composición en combinación con el fármaco o un metabolito del mismo para el tratamiento del cáncer o una infección viral. En algunas alternativas, la célula huésped es un linfocito humano primario, en el que la célula huésped comprende a) un ácido nucleico que comprende un primer promotor, que es un promotor sintético inducible que contiene un sitio de unión para un dominio de unión al ADN que no está presente naturalmente en el linfocito humano primario y b) un polinucleótido que codifica un activador transcripcional, comprendiendo el activador transcripcional i) el dominio de unión al ADN, en el que el dominio de unión al ADN no se une específicamente a una secuencia de ADN presente de forma natural en el linfocito humano primario; ii) un dominio que se une específicamente a un fármaco o metabolito del mismo y no se une o no se une con un grado de afinidad tan grande a ninguna molécula presente de forma natural en el linfocito humano primario y iii) un dominio de transactivación, en el que el activador transcripcional es capaz de inducir la transcripción del primer promotor en presencia del fármaco o metabolito del mismo y/o tras la unión del fármaco o metabolito del mismo al dominio en (ii). En algunas alternativas, la célula comprende además un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico, que opcionalmente está unido operativamente al primer promotor. En algunas alternativas, la célula comprende además un segundo promotor, que está operativamente unido al polinucleótido que codifica el activador transcripcional, en el que el segundo promotor es opcionalmente constitutivo. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula linfocítica T citotóxica CD8+ seleccionada del grupo que consiste en células T CD8+ no modificadas, células T CD8+ de memoria central, células T CD8+ de memoria efectora y células T CD8+ a granel. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula linfocítica T colaboradora CD4+ que se selecciona del grupo que consiste en células T CD4+ no modificadas, células T CD4+ de memoria central, células T CD4+ de memoria efectora y células T CD4+ a granel. En algunas alternativas, la composición comprende una célula huésped en un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas alternativas, la célula huésped es un linfocito humano primario, en el que la célula huésped comprende a) un ácido nucleico que comprende un primer promotor, que es un promotor sintético inducible que contiene un sitio de unión para un dominio de unión al ADN que no está presente de forma natural en el linfocito humano primario y b) un polinucleótido que codifica un activador transcripcional, comprendiendo el activador transcripcional i) el dominio de unión al ADN, en el que el dominio de unión al ADN no se une específicamente a una secuencia de ADN presente naturalmente en el linfocito humano primario; ii) un dominio que se une específicamente a un fármaco o metabolito del mismo y no se une o no se une con un grado de afinidad tan grande a ninguna molécula presente de forma natural en el linfocito humano primario y iii) un dominio de transactivación, en el que el activador transcripcional es capaz de inducir la transcripción del primer promotor en presencia del fármaco o metabolito del mismo y/o tras la unión del fármaco o metabolito del mismo al dominio en (ii). En algunas alternativas, la célula comprende además un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico, que opcionalmente está unido operativamente al primer promotor. En algunas alternativas, la célula comprende además un segundo promotor, que está operativamente unido al polinucleótido que codifica el activador transcripcional, en el que el segundo promotor es opcionalmente constitutivo. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula linfocítica T citotóxica CD8+

- seleccionada del grupo que consiste en células T CD8+ no modificadas, células T CD8+ de memoria central, células T CD8+ de memoria efectora y células T CD8+ a granel. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula linfocítica T colaboradora CD4+ que se selecciona del grupo que consiste en células T CD4+ no modificadas, células T CD4+ de memoria central, células T CD4+ de memoria efectora y células T CD4+ a granel. En algunas alternativas, la composición comprende un linfocito citotóxico T CD8+ seleccionado del grupo que consiste en células T CD8+ no modificadas, células T CD8+ de memoria central, células T CD8+ de memoria efectora y células T CD8+ a granel y un linfocito T colaborador CD4+ que se selecciona del grupo que consiste en células T CD4+ no modificadas, células T CD4+ de memoria central, células T CD4+ de memoria efectora y células T CD4+ a granel.
- En algunas alternativas, se proporciona una célula y un fármaco para su uso en el tratamiento o la inhibición del cáncer o una infección viral, en el que la célula comprende: (a) un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a un antígeno asociado con el cáncer o la infección viral, (b) un promotor sintético inducible, y (c) un activador transcripcional que contiene un dominio de unión al ADN que se une específicamente al promotor sintético y un dominio que se une específicamente al fármaco o un metabolito del mismo y es capaz de inducir la transcripción del promotor sintético en presencia del fármaco o de un metabolito del mismo. En algunas alternativas, el cáncer es un tumor sólido o una neoplasia maligna hematológica. En algunas alternativas, el tumor sólido se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer de próstata y cáncer de ovario.
- En algunas alternativas, se proporciona un método para realizar inmunoterapia celular en un sujeto que tiene cáncer o una infección viral en el que el método comprende administrar una composición o una célula huésped al sujeto y administrar el fármaco o metabolito del mismo, induciendo así la expresión de el promotor. En algunas alternativas, la célula huésped es un linfocito humano primario, en el que la célula huésped comprende a) un ácido nucleico que comprende un primer promotor, que es un promotor sintético inducible que contiene un sitio de unión para un dominio de unión al ADN que no está presente naturalmente en el linfocito humano primario y b) un polinucleótido que codifica un activador transcripcional, comprendiendo el activador transcripcional i) el dominio de unión al ADN, en el que el dominio de unión al ADN no se une específicamente a una secuencia de ADN presente de forma natural en el linfocito humano primario; ii) un dominio que se une específicamente a un fármaco o metabolito del mismo y no se une o no se une con un grado de afinidad tan grande a ninguna molécula presente de forma natural en el linfocito humano primario y iii) un dominio de transactivación, en el que el activador transcripcional es capaz de inducir la transcripción del primer promotor en presencia del fármaco o metabolito del mismo y/o tras la unión del fármaco o metabolito del mismo al dominio en (ii). En algunas alternativas, la célula comprende además un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico, que opcionalmente está unido operativamente al primer promotor. En algunas alternativas, la célula comprende además un segundo promotor, que está operativamente unido al polinucleótido que codifica el activador transcripcional, en el que el segundo promotor es opcionalmente constitutivo. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula linfocítica T citotóxica CD8+ seleccionada del grupo que consiste en células T CD8+ no modificadas, células T CD8+ de memoria central, células T CD8+ de memoria efectora y células T CD8+ a granel. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula linfocítica T colaboradora CD4+ que se selecciona del grupo que consiste en células T CD4+ no modificadas, células T CD4+ de memoria central, células T CD4+ de memoria efectora y células T CD4+ a granel. En algunas alternativas, la composición comprende una célula huésped en un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas alternativas, la célula huésped es un linfocito humano primario, en el que la célula huésped comprende a) un ácido nucleico que comprende un primer promotor, que es un promotor sintético inducible que contiene un sitio de unión para un dominio de unión al ADN que no está presente de forma natural en el linfocito humano primario y b) un polinucleótido que codifica un activador transcripcional, comprendiendo el activador transcripcional i) el dominio de unión al ADN, en el que el dominio de unión al ADN no se une específicamente a una secuencia de ADN presente naturalmente en el linfocito humano primario; ii) un dominio que se une específicamente a un fármaco o metabolito del mismo y no se une o no se une con un grado de afinidad tan grande a ninguna molécula presente de forma natural en el linfocito humano primario y iii) un dominio de transactivación, en el que el activador transcripcional es capaz de inducir la transcripción del primer promotor en presencia del fármaco o metabolito del mismo y/o tras la unión del fármaco o metabolito del mismo al dominio en (ii). En algunas alternativas, la célula comprende además un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico, que opcionalmente está unido operativamente al primer promotor. En algunas alternativas, la célula comprende además un segundo promotor, que está operativamente unido al polinucleótido que codifica el activador transcripcional, en el que el segundo promotor es opcionalmente constitutivo. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula linfocítica T citotóxica CD8+ seleccionada del grupo que consiste en células T CD8+ no modificadas, células T CD8+ de memoria central, células T CD8+ de memoria efectora y células T CD8+ a granel. En algunas alternativas, la célula huésped es una célula linfocítica T colaboradora CD4+ que se selecciona del grupo que consiste en células T CD4+ no modificadas, células T CD4+ de memoria central, células T CD4+ de memoria efectora y células T CD4+ a granel. En algunas alternativas, la composición comprende un linfocito citotóxico T CD8+ seleccionado del grupo que consiste en células T CD8+ no modificadas, células T CD8+ de memoria central, células T CD8+ de memoria efectora y células T CD8+ a granel y una célula linfocítica T colaboradora CD4+ que se selecciona del grupo que consiste en células T CD4+ no modificadas, células T CD4+ de memoria central, células T CD4+ de memoria efectora y células T CD4+ a granel. En algunas alternativas, el cáncer se selecciona entre un tumor sólido o una neoplasia maligna hematológica. En algunas alternativas, el tumor sólido se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer de próstata y cáncer de ovario.

Otro aspecto de la divulgación incluye un sistema genético para administrar la expresión transgénica regulada por fármacos en las células, tal como la expresión regulada por fármacos de una proteína recombinante tal como un receptor de antígeno recombinante y/o una molécula expresada por una célula que expresa un receptor de antígeno recombinante. En una alternativa, la expresión transgénica regulada se modifica en y/o está contenida dentro de células, tales como linfocitos, por ejemplo, para su uso en terapia celular adoptiva, tal como inmunoterapia adoptiva. Dichos sistemas proporcionan atributos de seguridad rigurosos a las terapias celulares, tales como las estrategias terapéuticas adoptivas del receptor de antígeno quimérico (CAR), generalmente sin sacrificar la intención curativa. En algunos aspectos, tales características permiten el control clínico en tiempo real de la expresión de proteínas recombinantes, por ejemplo, la expresión de CAR, *in vivo*. Mediante la modificación de vectores que permiten el control transcripcional sensible al fármaco del gen recombinante, por ejemplo, la expresión de CAR, la actividad del gen recombinante, por ejemplo, CAR, y/u otros mediadores celulares pueden "ACTIVARSE" y "DESACTIVARSE" *in vivo*, por ejemplo, con base en la entrada de un fármaco farmacéutico prescrito por un médico que exhibe una farmacocinética, una distribución tisular y un reparto clínicamente permisivo entre el espacio extracelular y el citosol de los linfocitos. El sistema genético proporciona la expresión transgénica regulada por el fármaco para reforzar un estado de "DESACTIVACIÓN" funcional en ausencia del fármaco y una expresión transgénica del estado "ACTIVADO" funcional en presencia del fármaco.

Una alternativa de dicho fármaco es el tamoxifeno. El tamoxifeno es un antagonista/agonista parcial de estrógeno que es un fármaco aprobado por la FDA y disponible comercialmente. Se toma por vía oral y se puede administrar a diario durante un período de tiempo prolongado. El tamoxifeno tiene un historial de seguridad probado, un perfil farmacocinético favorable, una distribución tisular excelente y un coeficiente de partición bajo entre el espacio extracelular y el citosol. También se pueden usar análogos funcionales de tamoxifeno. Pueden seleccionarse otros fármacos, por ejemplo, basándose en el historial de seguridad, perfil farmacocinético favorable, excelente distribución tisular, un bajo coeficiente de partición entre el espacio extracelular y el citosol y/o bajas toxicidades.

En algunas alternativas, el sistema emplea un regulador transcripcional sintético, por ejemplo, un activador transcripcional sintético, que, en presencia de tamoxifeno, puede inducirse a unirse a un promotor sintético unido operativamente, por ejemplo, secuencia arriba de un transgén, para inducir la expresión del promotor, por ejemplo, del transgén. En algunas alternativas proporcionadas en el presente documento, el activador transcripcional está regulado por un fármaco o metabolito del mismo, tal como un activador transcripcional o factor de transcripción regulado por tamoxifeno, que puede regularse, por ejemplo, inducido, por tamoxifeno o un análogo o metabolito del mismo. Ejemplos de factores de transcripción regulados por tamoxifeno son factores de transcripción quiméricos, tales como los que comprenden un dominio de unión al ADN específico para un promotor sintético del sistema, un dominio que se une específicamente al tamoxifeno y/o metabolito o metabolitos del mismo, por ejemplo, con afinidad superior a la afinidad del dominio por una molécula natural tal como estrógeno, y un dominio transactivador, tal como un dominio transactivador fuerte. Un factor de transcripción regulado por tamoxifeno ("TamR-tf", también denominado "HEA3") es un factor de transcripción quimérico compuesto de subunidades humanas, incluido el dominio de unión al ADN del extremo terminal N del factor nuclear de hepatocitos 1-alfa (HNF-1 α) fusionado en marco a una forma mutante (G521R) específica de tamoxifeno de un dominio de unión al ligando del receptor de estrógeno (ER-LBD), que se une a los metabolitos del tamoxifeno con alta afinidad en comparación con el estrógeno, que a su vez se fusiona con el dominio de activación de p65 de NF- κ B (p65). Se proporciona un ejemplo de secuencia de aminoácidos de un TamR-tf en la Tabla 10 y se identifica como la SEQ ID NO: 40. En esta secuencia, la forma mutante específica de tamoxifeno del dominio de unión al ligando del dominio de unión al ligando del receptor de estrógeno (ER-LBD) se encuentra en los aminoácidos 282-595 de TamR-tf y tiene una mutación en la posición 521, en comparación con el dominio de unión al ligando del receptor de estrógeno de tipo silvestre. El dominio de activación de p65 de NF- κ B (p65) se encuentra en los aminoácidos 596-862 de la SEQ ID NO: 40. Se pueden realizar cambios al activador transcripcional, por ejemplo, para aumentar las propiedades del factor de transcripción, incluyendo, sin limitación, alterar uno o más aminoácidos en el dominio de unión al ligando del receptor de estrógeno para aumentar la afinidad del factor por los análogos de estrógeno y alterar uno o más aminoácidos en el dominio de transactivación de p65. En algunas alternativas, se realizan cambios en el activador transcripcional que dan como resultado un factor de transcripción alterado que retiene o retiene sustancialmente una o más funciones de tamR-tf, tal como la unión específica de tamoxifeno y/o igual o sustancialmente igual o al menos la misma especificidad para tamoxifeno o metabolito en comparación con cualquier molécula natural, al menos la misma o aproximadamente la misma función de unión específica al ADN, y/o el mismo o al menos el mismo grado de actividad de transactivación.

En ausencia de tamoxifeno, el activador transcripcional, por ejemplo, TamR-tf, generalmente se excluye del núcleo mediante la unión de la proteína de choque térmico citosólico 90 (HSP90) al sitio activo de unión al tamoxifeno, dando como resultado la expresión de un transgén unido operativamente al promotor inducible por tamR-tf que está en el estado "DESACTIVADO". Las concentraciones nanomolares de tamoxifeno citosólico superan activamente a HSP90 por la unión a ER-LBD, lo que da como resultado la translocación de TamR-tf al núcleo. Tras la translocación nuclear, TamR-tf está fácilmente disponible para unirse a un promotor sintético restringido (por ejemplo, 7xHBD/EF1ap). En presencia de tamoxifeno, la unión de TamR-tf al promotor sintético, por ejemplo, el promotor 7xHBD/EF1ap, induce el estado de expresión "ACTIVADO" para un transgén unido operativamente al promotor sintético. En algunas alternativas, este regulador transcripcional puede modificarse para proporcionar un nivel variable de control de la expresión transgénica. Las sustituciones de aminoácidos en el LBD de TamR-tf permiten una respuesta selectiva al tamoxifeno y sus metabolitos, en la que el 4-hidroxi tamoxifeno (4-OHT) es el metabolito más activo

farmacológicamente, con respecto a la actividad de TamR-tf, mientras que carece de interacción con el estrógeno endógeno. En algunas alternativas, se proporciona un sistema para la expresión inducible del receptor de antígeno quimérico, en el que el sistema comprende: un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por un fármaco enlazado operativamente a un polinucleótido, tal como uno que codifica un receptor de antígeno quimérico, comprendiendo opcionalmente el receptor de antígeno quimérico un dominio de unión al ligando, en el que el dominio de unión al ligando se une a un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del 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 espaciador polipeptídico, en el que el espaciador proporciona opcionalmente una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular. En algunas alternativas, el sistema incluye además un segundo ácido nucleico que codifica un modulador transcripcional para el promotor inducible, que es capaz de modular, por ejemplo, activar, la transcripción del primer promotor, tal como en presencia del fármaco o metabolito del mismo; típicamente, el sistema comprende un segundo promotor constitutivo o inducible unido operativamente a un ácido nucleico que codifica el modulador transcripcional.

En algunas alternativas del sistema inducible, el primer promotor está operativamente unido a un polinucleótido que codifica un gen que promueve la supervivencia y proliferación celular, un gen que previene la apoptosis y/o un gen que inhibe la señalización de puntos de control negativa. Dichos genes incluyen genes que codifican quimeras IL-2, IL-15, receptores de quimiocinas, Bcl2, CA-Akt, dn-TGFbetaRIII, dn-SHP1/2 y/o PD-1/CD28.

En algunas alternativas, el sistema emplea un activador transcripcional sintético que, en presencia del fármaco (por ejemplo, tamoxifeno) o un metabolito del mismo, tal como después de la administración del fármaco, se induce a unirse a un promotor sintético secuencia arriba de un transgén para inducir la expresión. En algunas alternativas, el activador transcripcional es TamR-tf (HEA3) u otro activador transcripcional inducible por tamoxifeno con dominios análogos. El factor de transcripción regulado por tamoxifeno ("TamR-tf", también denominado "HEA3") es un factor de transcripción quimérico compuesto de subunidades humanas, incluido el dominio de unión al ADN del extremo terminal N del factor nuclear de hepatocitos 1-alfa (HNF-1 α) (por ejemplo, aminoácidos 1-281 de la SEQ ID NO: 40) fusionado en marco al dominio mutante de unión al ligando específico de tamoxifeno del dominio de unión al ligando del receptor de estrógeno (ER-LBD), que a su vez se fusiona con el dominio de activación de p65 de NF- κ B (p65).

En algunas alternativas de las composiciones de la presente invención, la célula linfocítica T auxiliar CD4+ son células T CD4+ no modificadas, células T CD4+ de memoria central, células T CD4+ de memoria efectora o células T CD4+ a granel. En algunas alternativas, la célula linfocítica colaboradora CD4+ es una célula T CD4+ no modificada, en la que la célula T CD4+ no modificada comprende una célula T CD45RO-, CD45RA+ y/o es una CD62L+ CD4+. En algunas alternativas, al menos el 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99 o el 100% de las células de la composición son CD4+; en algunas alternativas, al menos el 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99 o el 100% de las células en la composición o las células CD4+ en la composición son células T CD4+ no modificadas, células T CD4+ de memoria central CD4+, células T CD4+ de memoria efectora o células T CD4+ a granel.

En algunas alternativas de las composiciones de la presente de la invención, la célula linfocítica citotóxica T CD8+ es una célula T CD8+ no modificada, una célula T CD8+ de memoria central, una célula T CD8+ de memoria efectora y/o una célula T CD8+ a granel. En algunas alternativas, la célula linfocítica T citotóxica CD8+ es una célula T de memoria central, y la célula linfocítica T colaboradora CD4+ de memoria central comprende una célula T CD45RO+, CD62L+ y/o CD8+. En otras alternativas más, el linfocito T citotóxico CD8+ es un linfocito T de memoria central y el linfocito T auxiliar CD4+ es un linfocito T CD4+ es una célula T CD4+ no modificada o de memoria central. En algunas alternativas, al menos el 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99 o el 100% de las células en la composición son CD8+; en algunas alternativas, al menos el 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99 o el 100% de las células en la composición o las células CD8+ en la composición son células T CD8+ no modificadas, células T CD8+ de memoria central, células T CD8+ de memoria efectora o células T CD8+ a granel. En algunas realizaciones, al menos el 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99 o 100% de las células en la composición y/o de las células CD4+ y/o CD8+ en la composición, expresan el transgén o la molécula recombinante, tal como el CAR, y/o contienen el sistema de expresión.

Además, se proporcionan métodos para preparar composiciones que incluyen composiciones de inmunoterapia adoptiva, como las que contienen los sistemas, y usos o métodos para utilizar estas composiciones, como para realizar inmunoterapia celular en un sujeto que padece una enfermedad o trastorno.

En algunas alternativas, un método de fabricación de las composiciones comprende la obtención generando una célula modificada T colaboradora CD4+ no modificada o derivada o de una no modificada o de memoria central o derivada de memoria central o una población que la contiene, en la que la preparación de célula linfocítica T colaboradora modificada comprende células T CD4+ que tienen un receptor quimérico, tal como uno que comprende un dominio de unión al ligando específico para una molécula de superficie de la célula tumoral, un dominio espaciador, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular bajo el control de un promotor inducible como se describe en el presente documento. En algunas otras alternativas, las células CD4+ tienen un receptor de citocina o quimiocina bajo el control de un promotor inducible.

En algunas alternativas de los métodos descritos en el presente documento, las células T se administran con otras células T que no expresan CAR y/o producen proteínas inducibles por Tam. En algunas alternativas, el activador transcripcional para el CAR comprende un dominio de unión al ADN, un dominio de unión a tamoxifina/metabolito o un dominio de transactivación. En algunas alternativas, uno o más, generalmente todos, los dominios del activador transcripcional sintético son o se derivan de proteínas humanas, tales como dominios humanos o sustancialmente humanos. Tales características pueden reducir la inmunogenicidad de los constructos tras la administración a sujetos humanos, por ejemplo, en terapia celular.

Expresión en células Jurkat

Se estudió el estado "ACTIVADO" y "DESACTIVADO" de las células T Jurkat que expresan TamR ZsGreen.

Constructos

En algunas alternativas, este sistema implica dos componentes: 1) expresión constitutiva de HEA-3 enlazada a un solo transgén o conjunto de transgenes por dominios de salto-enlazador T2A y 2) expresión condicional de un transgén que está bajo el control del promotor sintético restringido por HEA-3 7xHBD/mEF1ap por el que se produce la inducción del transgén en respuesta al tamoxifeno. Dependiendo del uso deseado del control genético de TamRLV, se puede usar una combinación de sistemas de administración y composiciones de vector. A continuación se describe la construcción de constructos.

Una alternativa del sistema TamR-LV permite la expresión constitutiva de HEA-3 y la expresión inducible de receptores de antígenos ZsGreen o quiméricos, lo que permite el análisis cinético y el efecto biológico controlado de manera "ACTIVADA" y "DESACTIVADA" por la presencia o ausencia de tamoxifeno. Para ello, se utilizaron dos constructos: 1) HEA-3 es impulsado por el promotor de EFla humano y se une a la proteína marcadora de transmembrana EGFR troncada construida (EGFRt) mediante una secuencia de salto-enlazador T2A y se clona en una tercera generación del plásmido de empaquetamiento de lentivirus que autoinactiva ePHIV7 (constructo A). (Véase la Tabla 10; SEQ ID NO: 39; Tabla 1: SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9) y 2) 7xHBD/mEF1ap controla la expresión dependiente de tamoxifeno de ZsGreen clonado en pcADN3.1 (-) que fue modificado por carecer del promotor del CMV usado comercialmente (constructo B) (Véase la Tabla 12; SEQ ID NO: 41). ZsGreen1 es una variante humana de ZsGreen de codón optimizado que codifica la proteína verde fluorescente más brillante disponible comercialmente (disponible a través de Clontech).

Métodos

Se transdujeron células Jurkat a una MOI de 5 con los constructos de empaquetamiento de lentivirus descritas anteriormente en los que se aplica un enfoque de empaquetamiento dual en el que cada plásmido se cotransfecta en células 293T durante la producción lentiviral. Este constructo utilizó una relación molar de 1: 2 del constructo A con respecto al constructo B. El constructo A codifica el factor de transcripción quimérico HEA3 unido mediante una secuencia de escisión ribosómica, T2A, al marcador de seguimiento y selección EGFRt. El constructo B codifica el promotor sintético que responde a HEA3, 7xHBD/mE1b, que regula la expresión del transgén ZsGreen-DR1, un gen informador fluorescente verde de vida media corta.

Después de la transducción, las células se expandieron en cultivo, enriquecidas para la expresión de EGFRt utilizando la selección de perlas magnéticas de Miltenyi, hasta una pureza > 99%. Después de una mayor expansión en cultivo, las células se recolectaron y trataron con etanol (vehículo) como control negativo o 4-hidroxitamoxifeno (4-OHT) 500 nM durante 24 horas, y luego se recolectaron, se tiñeron con Erbitux-biotina seguido de SA-APC, y se analizaron para determinar la expresión de APC y la expresión de ZsGreen mediante citometría de flujo. Los resultados se muestran en la Figura 1.

Respuesta a la dosis

Las células se recolectaron y luego se sometieron a tratamiento con 4-OHT con concentraciones que variaban de 0 nM a 1.000 nM, como se indica. Las muestras se recolectaron, lavaron y tiñeron con EGFRt-biotina, seguido de estreptavidina-APC, y luego se analizaron mediante citometría de flujo para determinar la expresión de ZsGreen. Los resultados se muestran en la Figura 2.

Cinética de la constante de asociación y disociación

La población se sometió a estimulación con 4-OHT 500 nM durante 48 horas, y luego se clasificaron para células ZsGreen+ utilizando FACS, produciendo una población de ZsGreen+ > 99% en el análisis inmediatamente posterior a la clasificación. Posteriormente, las células se expandieron en cultivo durante 3 semanas y luego se prepararon para estudios cinéticos. Las células se dividieron en 3 grupos de tratamiento: (1) sin 4-OHT, (2) 4-OHT 200 nM (añadido cada 48 horas), (3) 4-OHT 200 nM durante 24 horas, seguido de lavado 1x en PBS, luego cultivo en medio libre de 4-OHT durante 14 días, seguido de una reestimulación de 24 horas con 4-OHT a 200 nM, y luego se elimina por lavado

1x en PBS. En cada punto de tiempo, se recolectaron muestras y se analizaron mediante citometría de flujo para la expresión de ZsGreen. Los resultados se muestran en la Figura 3 y se presentan como % ZsGreen+.

Resultados

Los resultados de la Figura 1 muestran que en presencia de 4-hidroxi tamoxifeno (4-OHT), aproximadamente el 50% de las células expresan ZsGreen, lo que indica que estas células tienen ambas constructos A y B y que la 4-OHT induce la expresión del constructo B. Los resultados de la curva de respuesta a la dosis muestran que una concentración de 200 nM o mayor de 4-OHT fue eficaz para inducir la expresión del transgén en células transducidas (Figura 2). Los resultados de la Figura 3 muestran que a medida que la 4-OHT se elimina por lavado del cultivo, la expresión de ZsGreen cae a menos del 10% de la actividad máxima de ZsGreen en 5 días. Cuando se vuelve a agregar 4-OHT, la actividad de ZsGreen vuelve a aproximadamente el 100% de la actividad máxima en 2 días.

Discusión

Estos experimentos muestran que las células T Jurkat humanas se pueden transducir con un lentivirus empaquetado dual con un componente constitutivo y un componente inducible. La expresión del gen ZsGreen se induce en presencia de 4-OHT en respuesta a la dosis. Además, el lavado de 4-OHT del cultivo celular dio como resultado una disminución en la expresión de ZsGreen que podría volver a estimularse mediante la adición de 4-OHT de nuevo a las células.

Expresión en células de memoria central CD4 primarias y células de memoria central CD8.

Se estudió el estado "ACTIVADO" y "DESACTIVADO" de las células T de memoria central CD4 y CD8 que expresan TamR ZsGreen.

Constructos

En algunas alternativas, este sistema implica dos componentes: 1) expresión constitutiva de HEA-3 enlazada a un solo transgén o conjunto de transgenes por dominios de salto-enlazador T2A (constructo A) (véase la Tabla 10; SEQ ID NO: 39; Tabla 1 SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9) y 2) expresión condicional de un transgén que está bajo el control del promotor sintético restringido por HEA-3 7xHBD/mEF1ap por lo que la inducción del transgén ocurre en respuesta al tamoxifeno (constructo B) (véase la Tabla 12; SEQ ID NO: 41). Dependiendo del uso deseado del control genético de TamRLV, se puede usar una combinación de sistemas de administración y composiciones del vector. Los constructos se prepararon como se describió anteriormente.

Métodos

Se obtuvieron células de memoria central CD4 a partir de sangre periférica seleccionando células mediante citometría de flujo para los marcadores CD4 y CD62L y negativas para CD45RO. Las células se cultivaron con perlas anti-CD3/anti-CD28 durante 3 días.

Se obtuvieron células de memoria central CD8 a partir de sangre periférica seleccionando células mediante citometría de flujo para los marcadores CD8 y CD62L y negativas para CD45RO. Las células se cultivaron con perlas anti-CD3/anti-CD28 durante 3 días.

Después de 3 días, las células de memoria central CD4 o CD8 se transdujeron a una MOI de 5 con los constructos de empaquetamiento de lentivirus descritos anteriormente en las que un enfoque de empaquetamiento dual en el que cada plásmido se cotransfecta en células 293T durante la producción lentiviral. Este constructo utilizó una relación molar de 1: 2 del constructo A con respecto al constructo B. El constructo A codifica el factor de transcripción quimérico HEA3 unido mediante una secuencia de escisión ribosómica, T2A, al marcador de seguimiento y selección EGFRt. El constructo B codifica el promotor sintético que responde a HEA3, 7xHBD/mE1b, que regula la expresión del transgén ZsGreen-DR1, un gen informador fluorescente verde de vida media corta.

El día 21 después de la transducción, las células se enriquecieron en EGFRt y posteriormente se expandieron con células alimentadoras, IL2 e IL15. Después de la expansión, las células se dividieron en 3 grupos de tratamiento, 4-OHT solo (A), 4-OHT combinado con tratamiento conjunto de perlas CD3/CD28 (B) o 4-OHT solo durante 48 horas, seguido de la adición de perlas CD3/CD28 (C). También se obtuvieron muestras correspondientes sin 4-OHT para comparación. Todas las muestras se recogieron en los puntos de tiempo indicados después del tratamiento con 4-OHT, se tiñeron con anticuerpo EGFRt-biotina, seguido de SA-APC, y se analizaron por citometría de flujo. Los resultados se muestran en la Figura 4 (memoria central CD4) y la Figura 5 (memoria central CD8).

Resultados

Los resultados muestran que las células CD4 transducidas con el vector de plásmido dual requerían la presencia de un estímulo de activación para expresar el ZsGreen incluso en presencia de tamoxifeno. Véase la Figura 4B. Aproximadamente el 70% de las células CD4 transducidas primarias en presencia de tamoxifeno y perlas antiCD3/anti-

CD28 expresaron ZsGreen. La expresión génica se observó cuando se produjo la activación después de un tratamiento de 48 horas con tamoxifeno. Véase la Figura 4C.

Los resultados muestran que las células CD8 transducidas con el vector de plásmido dual también requerían la presencia de un estímulo de activación para expresar el ZsGreen incluso en presencia de tamoxifeno. Véase la Figura 5B. Aproximadamente el 37% de las células CD8 transducidas primarias en presencia de tamoxifeno y perlas anti-CD3/anti-CD28 expresaron ZsGreen. La expresión génica se observó cuando se produjo la activación después de un tratamiento de 48 horas con tamoxifeno. Véase la Figura 5C.

Estos resultados muestran que las células T de memoria central primaria transducidas con un constructo inducible pueden expresar el transgén en presencia del inductor tras la activación con células antiCD3/CD28. Sin embargo, las células no activadas que expresan el transgén pueden aislarse fácilmente usando clasificación inmunomagnética o por citometría de flujo.

Construcción de TamR --- CD19CARLV

La construcción del vector se llevó a cabo mediante empaquetamiento doble de plásmidos de transferencia que alojaban constructos como se describió anteriormente en una relación molar de plásmido de 1:1 (véase la Figura 6C y 7C). El constructo A bajo el promotor constitutivo EF-1 alfa codifica TamR-tf (HEA3) enlazado a través de una secuencia de escisión ribosómica, T2A, al marcador de seguimiento y selección EGFRt (véase la Tabla 10; SEQ ID NO: 39, Tabla 1: SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9). El constructo B contiene el promotor 7xHBD/mElb con ADNc del transgén secuencia abajo que incluye CD19CAR enlazado a través de la secuencia de escisión 2a a Her2t, un marcador de seguimiento y selección (véase la Tabla 12; SEQ ID NO: 41; Tabla 2 SEQ ID NO: 10; Tabla 13; SEQ ID NO: 44). Se preparó otra constructo añadiendo un marcador selectivo adicional DHFRdm (véase la Tabla 14; SEQ ID NO: 46).

Se transdujeron células Jurkat humanas a una MOI de 2, luego se expandieron en cultivo y se seleccionaron para células EGFRt+ mediante selección de perlas magnéticas. Después de una expansión adicional, las células se trataron con vehículo solo (EtOH) o 4-OHT 500 nM y se recolectaron para citometría de flujo. Las muestras se tiñeron con anticuerpo EGFRt-APC y Herceptina-biotina, seguido de SA PE. También se prepararon muestras para transferencia Western, el anticuerpo principal utilizado es un mAb de ratón anti-CD247 que reconoce la cadena intracelular CD3 zeta en el CD19CAR (~ 48 kDa). El CD3 zeta endógeno migra a ~ 23 kDa. Los resultados se muestran en la Figura 6.

Células T Jurkat transducidas con TamR CD19CAR LV que contiene un marcador selectivo

La construcción de TamR CD19CAR LV se realizó mediante empaquetamiento dual de los constructos A y B. El constructo A contiene HEA3 enlazado mediante una secuencia de escisión ribosómica, T2A, al marcador de seguimiento y selección EGFRt. El constructo B contiene el promotor 7xHBD/mE1b con un transgén secuencia abajo que consiste en CD19CAR unido a través de la secuencia de escisión 2a a Her2t, un marcador de seguimiento y selección, unido a través de otra secuencia de escisión 2a (P2A) a DHFRdm, un gen de selección de metotrexato.

Las células se transdujeron con TamR CD19CAR LV a una MOI de 1, se expandieron en cultivo y se seleccionaron para EGFRt mediante selección de perlas magnéticas. Después de una expansión adicional, las células se trataron con vector solo (EtOH) o 4-OHT 500 nM y se recolectaron para citometría de flujo (panel superior). Figura 7. Las muestras se tiñeron con anticuerpo EGFRt-APC y Herceptina-biotina, seguido de SA-PE. Parental (Jurkat no transducidas) se muestra a modo de comparación. También se prepararon muestras para transferencia Western, el anticuerpo principal utilizado es un mAb de ratón anti-CD247 que reconoce la cadena intracelular CD3 zeta en el CD19CAR (~ 48 kDa). La CD3 zeta endógena migra a ~ 23 kDa.

Resultados

Los resultados muestran que EGFRt se detecta en el 94,6% de las células transducidas con un constructo que no incluye el marcador selectivo adicional DHFRdm. Véase la Figura 6B. La Figura 6C muestra que en presencia de tamoxifeno, aproximadamente el 42,6% de las células transducidas con un constructo que no incluye DHFRdm expresaron tanto EGFRt como Her2t. Las células que expresan ambos marcadores expresaron la cadena CD3 zeta como parte del constructo de CAR (48 kDa) como la detectada en la transferencia Western. Véase la Figura 6B.

La Figura 7 muestra que el 85,9% de células Jurkat transducidas con un constructo que incluye otra secuencia de escisión 2a (P2A) a DHFRdm en ausencia de tamoxifeno expresan EGFRt. En presencia de tamoxifeno, aproximadamente el 7,5% de las células expresaron tanto EGFRt como Her2t. Las células que expresan ambos marcadores expresaron la cadena CD3 zeta como parte del constructo CAR (48 kDa) como se detecta en la transferencia Western. Véase la Figura 7B.

La expresión inducible de CD19 CAR se muestra en células Jurkat transducidas. La inducción se puede medir detectando la expresión del marcador Her2t así como detectando la expresión de CD19CAR usando transferencia

Western. La adición de un marcador seleccionable adicional, DHFRdm, al constructo inducible no mejoró la expresión del gen inducible.

Células T TCM CD4 humanas transducidas con TamR CD19CAR LV

Se obtuvieron células de memoria central CD4 a partir de sangre periférica seleccionando células mediante citometría de flujo para los marcadores CD4 y CD62L y negativas para CD45RO. Las células se cultivaron con perlas anti-CD3/anti-CD28 durante 3 días. Después de 3 días, las células CD4 de memoria central se transdujeron a una MOI de 5 con un lentivirus que empaqueta los constructos A y B. (Figura 8B). El constructo A codifica el factor de transcripción quimérico HEA3 unido mediante una secuencia de escisión ribosómica, T2A, al marcador de seguimiento y selección EGFRt (véase la Tabla 10; SEQ ID NO: 39; Tabla 1; SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9). El constructo B codifica el promotor sintético que responde a HEA3, 7xHBD/mElb, que regula la expresión del transgén enlazado a CD19CAR mediante un T2A a Her2t para seguimiento y selección, y mediante una segunda secuencia 2a, P2A, al gen de selección de metotrexato DHFRdm (véase la Tabla 12; SEQ ID NO: 41; Tabla 2 SEQ ID NO: 10; Tabla 13; SEQ ID NO: 44; Tabla 14; SEQ ID NO: 46).

El día 21 después de la transducción, las células se enriquecieron en EGFRt utilizando la selección de perlas magnéticas y posteriormente se expandieron con células alimentadoras irradiadas, IL2 e IL15. Dos semanas después de la expansión, las células se criopreservaron. En el experimento representado anteriormente, se descongelaron células CEM CD4+ que fueron transducidas de forma simulada, o CD4+TamR CD19CAR LV, y se colocaron en cultivo con perlas CD3/CD28, IL-2, IL-15. Se trataron o no CD4+TamRCD19CAR LV con 4OHT 500 nM durante 24 horas. Todas las muestras se recolectaron, lavaron, luego se tiñeron con un anticuerpo EGFRt-APC y Her2t-biotina, seguido de SA-PE, y se analizaron mediante citometría de flujo. Los resultados se muestran en la Figura 8.

Resultados

Los resultados de la Figura 8 muestran que, en ausencia de tamoxifeno, el 75,6% de las células de memoria central CD4 primarias transducidas expresan EGFRt, lo que indica la expresión constitutiva del constructo A. En presencia de tamoxifeno y un estímulo activador (por ejemplo, perlas antiCD3/antiCD28), aproximadamente el 14,7% de las células primarias expresan tanto EGFRt como Her2t.

Las células CD4 primarias transducidas con un vector inducible en presencia del inductor y un estímulo activador expresan el transgén bajo el control del promotor inducible detectado por la expresión del gen marcador Her2t. Sin embargo, las células no activadas que expresan el transgén pueden aislarse fácilmente usando clasificación inmunomagnética o por citometría de flujo. La caracterización adicional de estas células implicará la detección de la expresión de CD19CAR.

Tabla 1

Secuencia del receptor quimérico de espaciador corto anti-CD19

GMCSFRss-CD 19scFv- IgG4bisagra-CD28tm-41BB-Zeta- T2A-EGFRt

Atgctgctgctggtgaccagcctgctgctgtgcgagctgccccaccccgctttctgctgatcccc (GMCSFRss) (SEQ ID NO:2)

Gacatccagatgaccagaccacctccagcctgagcgccagcctggggcaccgggtgacatcagctgcggggccagccaggac
atcagcaagtacctgaactggtatcagcagaagcccgacggcaccgtcaagctgctgatctaccacaccagccggctgcacagcgg
cgtgccagccgggttagcggcagcgggtccggcaccgactacagcctgaccatctccaacctggaacaggaagatatgccacct
acttttccagcagggcaacacactgccctacacctttggcgcggaacaagctggaaatcaccggcagcacctccggcagcggc
aagcctggcagcggcgagggcagcaccaagggcgagggtgaagctgcaggaaagcggccctggcctggtggccccagccaga
gcctgagcgtgacctgcaccgtgagcggcgtgagcctgccgactacggcgtgagctggatccggcagccccccaggaagggcc
tggaatggctgggcgtgatctggggcagcgagaccacctactacaacagcgccttgaagagccggctgaccatcatcaaggaaa
cagcaagagccagggtgttctgaagatgaacagcctgcagaccgacgacaccgccatctactactgcgccaagcactactactacg
gcggcagctacgccatggactactggggccagggcaccagcgtgaccgtgagcagc (CD19scFv) (SEQ ID
NO:3)

Gaatctaagtacggaccgccctgcccccttgccct (IgG4bisagra) (SEQ ID NO:4)

Secuencia del receptor quimérico de espaciador corto anti-CD19

Atgttctgggtgctggtggtggtcggaggcgtgctggcctgctacagcctgctgggtcaccgtggccttcatcatcttttgggtg (CD28tm-) (SEQ ID NO: 5)

Aaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagct
gccgattccagaagaagaagaaggaggatgtgaactg (41BB) (SEQ ID NO:6)
(continuación)

Cgggtgaagttcagcagaagcgccgacgcccctgcctaccagcagggccagaatcagctgtacaacgagctgaacctgggcaga
aggggaagagtacgacgtcctggataagcgggagaggccgggaccctgagatgggcggcaagcctcggcgggaagaacccccagga
aggcctgtataacgaactgcagaaagacaagatggccgagggcctacagcgagatcggcatgaaggcgagcggaggcggggca
agggccacgacggcctgtatcagggcctgtccaccgccaccaaggatacctacgacgcccctgcacatgcaggccctgcccccaag
g (CD3Zeta)- (SEQ ID NO:7)

Ctcgagggcgccggagagggcagaggaagtcttcaacatcggtgacgtggaggagaatcccgccctagg (T2A) (SEQ ID NO:8)
Atgcttctcctggtgacaagcctctgctctgtgagttaccacaccagcattcctcctgatccacgcaaagtgtgtaacggaatagg
tattggtgaatttaaagactcactctccataaatgctacgaatattaaacacttcaaaaactgcacctccatcagtggcgatctccacatc
ctgccggtggcatttaggggtgactccttcacacatactcctcctctggtatccacaggaactggatattctgaaaaccgtaaaggaaat
cacagggtttttgctgattcaggcttggcctgaaaacaggacggacctccatgcctttgagaacctagaaatcatacgcggcaggacc
aagcaacatggtcagttttctcttcagtcgctcagcctgaacataacatccttgggattacgctccctcaaggagataagtgtgagat
gtgataatttcaggaaacaaaaattgtgctatgcaaatacaataaactggaaaaaactgtttgggacctcgggtcagaaaaccaaatt
ataagcaacagaggtgaaaacagctgcaaggccacaggccaggtctgccatgccttgtgctcccccgagggtgctggggcccg
agcccagggactgcgtctcttgcgggaatgtcagccgaggcaggggaatgcgtggacaagtgcaccttctggagggtgagccaag
ggagtttgggagaactctgagtgacatacagtgccacccagagtgccctcaggccatgaacatcacctgcacaggacggggac
cagacaactgtatccagtggtgcccactacattgacggccccactgcgtcaagacctgcccggcaggagtcagggagaaaacaac
accctggtctggaagtacgcagacgcccggccatgtgtgccacctgtgccatccaaactgcacctacggatgcactgggcccaggtctt
5 gaaggctgtccaacgaatgggcctaagatcccgtccatgccactgggatgggtggggccctcctcttgcctgctggtggtggccctg
gggatcggcctcttcattgta (EGFRt) (SEQ ID NO:9)

Tabla 2.

GMCSFRss

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

CD19scFv

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

ADN: CTGATCTACCACACCAGCCGGCTGCACAGCGGCTGCCAGCCGGTTTAGC
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: AGCGGCCCTGGCCTGGTGGCCCCAGCCAGAGCCTGAGCGTGACCTGCACC
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: AAGAGCCAGGTGTTTCCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCC
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

IgG4bisagra

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

CD28tm

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

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

41BB

ADN: GTG:AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATG

ES 2 880 932 T3

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

ADN: AGACCACTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCTCA
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: GACGCCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAATCAGCTGTACAACGAGCTGAAC
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: CCTGAGATGGGCGGAAGCCTCGGCGGAAGAACCCCCAGGAAGGCCTGTAT
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: TCCACCGCCACCAAGGATACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCC
AA: S T A T K D T Y D A L H M Q A L P

T2A

ADN: CCAAGG:CTCGAGGGCGGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGT
AA: P R L E G G G E G R G S L L T C G

EGFRt

ADN: GACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGG:ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTT
AA: D V E E N P G P R M L L L V T S L

ADN: CTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCTCCTGATCCCACGCAAAGTG
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: ACGAATATTAAACACTTCAAAAAGTGCACCTCCATCAGTGGCGATCTCCAC
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: GATCCACAGGAAGTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGGGTTT
AA: D P Q E L D I L K T V K E I T G F

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

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

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

ADN: CATGCCTTGCTGCTCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCGAGGCCAGGGACTGC
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: GGACCAGACAACTGTATCCAGTGTGCCCACTACATTGACGGCCCCCACTGC
AA: G P D N C I Q C A H Y I D G P H C

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

ADN: AAGTACGCAGACGCCGCCATGTGTGCCACCTGTGCCATCCAACTGCACC
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:10)
AA: V A L G I G L F M * (SEQ ID NO:11)

Tabla 3

ZXR-014 Secuencias de nucleótidos y aminoácidos (mapa de secciones)

GMCSFRss: nt2084-2149 (SEQ ID NO: 50)

CD19scFv: nt2150-2884 (SEQ ID NO: 51)

Igg4Bisagra: nt2885-2920 (SEQ ID NO: 52)

CD28tm: nt2921-3004 (SEQ ID NO: 53)

41BB: nt3005-3130 (SEQ ID NO: 54)

Zeta: nt3131-3466 (SEQ ID NO: 55)

T2A: nt3467-3538 (SEQ ID NO: 56)

EGFRt: nt3539-4612 (SEQ ID NO: 57)

Cebadores para secuenciación:

Nombre del oligo	Secuencia	Región
oJ02649	ATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGT	pre-U5 (SEQ ID NO:22)
oJ02648	CCGTACCTTTAAGACCAATGACTTAC	de1U3 (SEQ ID NO:23)
oJ02650	TTGAGAGTTTTCGCCCCG	mid-Ampr (SEQ ID NO:24)
oJ02651	AATAGACAGATCGCTGAGATAGGT	post-Ampr (SEQ ID NO:25)
oJ02652	CAGGTATCCGGTAAGCGG	CoE1 ori (SEQ ID NO:26)
oJ02653	CGACCAGCAACCATAGTCC	SV40 (SEQ ID NO:27)
oJ02654	TAGCGGTTTGAATCACGG	CMV (SEQ ID NO:28)
oJ02655	GCAGGGAGCTAGAACGATTC	psi (SEQ ID NO:29)
oJ02656	ATTGTCTGGTATAGTGCAGCAG	RRE (SEQ ID NO:30)
oJ02657	TCGCAACGGGTTTGCC	EF1p (SEQ ID NO:31)
oJ02658	AGGAAGATATCGCCACTACT	CD19Rop (SEQ ID NO:32)
oJ02601	CGGGTGAAGTTCAGCAGAAG	Zeta (SEQ ID NO:33)
oJ02735	ACTGTGTTTGCTGACGCAAC	WPRe (SEQ ID NO:34)
oJ02715	ATGCTTCTCCTGGTGACAAG	EGFRt (SEQ ID NO:35)

Tabla 4. Uniprot P0861 IgG4-Fc (SEQ ID NO: 13)

5

10	20	30	40	50	60
ASTKGPSVFP	LAPCSRSTSE	STAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS
70	80	90	100	110	120
GLYSLSVVVT	VPSSSLGTKT	YTCNVDHKPS	NTKVDKRVES	KYGPFPSPSCP	APEFLGGPSV
130	140	150	160	170	180
FLFPKPKDIT	LMISRTPEVT	CVVVDVSQED	PEVQFNWYVD	GVEVHNAKTK	FREEQFNSTY
190	200	210	220	230	240
RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK	CKVSNKGLPS	SIEKTISKAK	GQPREPQVYT	LPPSQEEMTK
250	260	270	280	290	300
NQVSLTCLVK	GFYPSTIAVE	WESNGQPENN	YKTPPVLDL	DGSFFLYSRL	TVDKSRWQEG
310	320				

NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSLGK

10

1-98 CH1 (SEQ ID NO: 59)

99-110 Bisagra (SEQ ID NO: 60)

15

111-220 CH2 (SEQ ID NO: 61)

221-327 CH3 (SEQ ID NO: 62)

Posición 108 S→P (SEQ ID NO: 63)

20

ES 2 880 932 T3

Tabla 5. Uniprot P10747 CD28 (SEQ ID NO: 14)

10	20	30	40	50	60
MLRLLLLALNL	FPSIQVTGNK	ILVKQSPMLV	AYDNAVNLSC	KYSYNLFSRE	FRASLHKGLD
70	80	90	100	110	120
SAVEVCVVYG	NYSQQQLQVYS	KTGFNCDGKL	GNESVTFYLQ	NLYVNQTDIY	FCKIEVMYPP
130	140	150	160	170	180
PYLDNEKSNG	TIHVKGKHL	CPSPLFPGPS	KPFWVLVVVG	GVLACYSLLV	TVAFIIFWVR
190	200	210	220		

SKRSR**LL**LHSD YMNMTPRRPG PTRKHYQPYA PPRDFAAYRS

- 5 1-18 péptido señal (SEQ ID NO: 64)
- 19-152 dominio extracelular (SEQ ID NO: 65)
- 153-179 dominio transmembrana (SEQ ID NO: 66)
- 10 180-220 dominio intracelular (SEQ ID NO: 67)
- Posición 186-187 LL→GG (SEQ ID NO: 68)

15

Tabla 6. Uniprot Q07011. 4-1BB (SEQ ID NO: 15)

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

- 20 CSCRFFEEEE GGCEL
- 1-23 péptido señal (SEQ ID NO: 69)
- 24-186 dominio extracelular (SEQ ID NO: 70)
- 25 187-213 dominio transmembrana (SEQ ID NO: 71)
- 214-255 dominio intracelular (SEQ ID NO: 72)
- 30 Tabla 7. Uniprot P20963 Isoforma 3 CD3 ζ humana (SEQ ID NO: 16)

<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	EEYDVLDRR	GRDPEMGGKP	QRRKNPQEG	YNELQKDKMA
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>		

EAYSEIGMKG ERRRGKGHDG LYQGLSTATK DTYDALHMQA LPPR

- | | |
|----|---|
| 5 | 1-21 péptido señal (SEQ ID NO: 73) |
| | 22-30 dominio extracelular (SEQ ID NO: 74) |
| | 31-51 dominio transmembrana (SEQ ID NO: 75) |
| 10 | 52-164 dominio intracelular (SEQ ID NO: 76) |
| | 61-89 ITAM1 (SEQ ID NO: 77) |
| 15 | 100-128 ITAM2 (SEQ ID NO: 78) |
| | 131-159 ITAM3 (SEQ ID NO: 79) |

Tabla 8. Ejemplos de secuencias de la región bisagra

IgG1 Humana EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 17)
IgG2 Humana ERKCCVECP (SEQ ID NO: 18)
IgG3 Humano ELKTPLGDTHTCPRCP (EPKSCDTPPCPRCP)₃ (SEQ ID NO: 19)
IgG4 Humana ESKYGPPCPSPC (SEQ ID NO: 20)
IgG4 Humana modificada ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO: 21)
IgG4 Humana modificada YGPPCPPCP (SEQ ID NO: 36)
IgG4 Humana modificada KYGPPCPPCP (SEQ ID NO: 37)
IgG4 Humana modificada EWKYGPPCPPCP (SEQ ID NO: 38)

Tabla 9. Espaciador corto del constructo de Her2 (SEQ ID NO: 1)

GMCSFss-Her2scFv-IgG4bisagra-CD28tm-41BB-Zeta-T2A-EGFRt

Líder

Atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacacccgacattcctcctgatccca (SEQ ID NO: 80)

Her2scFV

Gatattccagatgaccagttccctcgagctccctgtccgcctctgtggggcgatagggtaccatcacctgccgtgccagtcaggatgtg
aatactgctgtagcctgggtatcaacagaaccaggaaaagctccgaaactactgattactcggcatccttctctactctggagtcct
tctcgcttctctggttcagatctgggacggatttactctgaccatcagcagctctgcagccggaagacttcgcaactattactgtcagc
aacattatactactctcccacgttcggacaggggtaccaaggtggagatcaaaggcagtagcggcgggtggctccggggggcgga
tccggtggggcgggcagcagcgagggttcagctggtgagcttggcgggtggcctggtgcagccaggggggtcactccgtttgtcctgt
gcagcttctggcttcaacattaaagacacctatatactgggtgcgtcaggccccgggtaagggcctggaatgggttgcaaggattt
atcctacgaatggttatactagatatgccgatagcgtcaaggggccgttcaactaagaagcgagacacatccaaaacacagcctacct
gcagatgaacagcctgcgtgctgaggacactgccgtctattattgttctagatggggagggggacggcttctatgctatggactactggg
gtcaagggaacctcgtcacctgtcaggt (SEQ ID NO: 81)

Espaciador Bisagra

Gagagcaagtacggaccgcccctgcccccttgccct (SEQ ID NO: 82)

CD28tm

Atgttctgggtgctggtggtggcgaggcgtgctggcctgctacagcctgctggtcaccgtggccttcatcatcttttgggtg (SEQ ID NO: 83)

4-1BB

Aaacggggcagaaagaactcctgtatatattcaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtag
ctgccgatttcagaagaagaaggaggatgtgaactg (SEQ ID NO:84)

CD3 zeta

T2A

atgcttctcctggtgacaagcctctgctctgtgagttaccacaccagcattcctcctgatccacgcaaagtgtgtaacgggaataggt
attggtgaatttaagactcactctccataaatgtacgaatattaaacacttcaaaaactgcacctccatcagtgggcgatctccacatc
ctgccgggtggcatttaggggtgactccttcacacatactcctcctctggatccacaggaactggatattctgaaaaccgtaaaaggaaat
cacagggtttttgtgattcaggcttgccctgaaaacaggacggacctccatgccccttgagaacctagaaatcatacggcggcaggacc
aagcaacatggtcagttttctctgcagctgcagcctgaacataacatcctgggattacgctcccacaaggagataagtgatggagat
gtgataatttcaggaaacaaaatttgtctatgcaatacaataaactggaaaaaactgtttgggacctccggctcagaaaacaaaa
ttataagcaacagagggtgaaaacagctgcaaggccacaggccagggtctgccatgcccctgtgctccccgaggggctgctggggccc
gagcccaggggactgcgtctcttgcgggaatgtcagccgaggcagggaatgcgtggacaagtgcacacctctggagggtgagccaa
gggagtttctggagaactctgagtcatacagtgccaccagagtgctcctgcctcaggccatgaacatcacctgcacaggacggggga
ccagacaactgtatccagtggtgccactacattgacggcccccactgcgtcaagacctgcccggcaggagtcattgggagaaaacaa
caccctggtctggaagtacgcagacgcccggccatgtgtgccacctgtgccatccaaactgcacctacggatgcactgggccaggtct

10

Nucleótido de HEA3 (SEQ ID NO: 39) y secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 40)

15

Tabla 11. Ácido nucleico de TamR-tf (HEA4) (SEQ ID NO: 42), secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 43)

5 Nucleótido de HEA4 (SEQ ID NO: y secuencia de aminoácidos

[illegible]

Tabla 12. Secuencia de ácido nucleico de 7xHBD/mEF1 α (SEQ ID NO: 41)

T'agttaataatctacaatatgtaataatctacaatatgtaataatctacaatatgtaataatctacaatatgtaataatctacaatatgtaataatctacaa
tagttaataatctacaa

5

Tabla 13. Ácido nucleico de Her2t (SEQ ID NO: 44) y secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 45)

Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de HER2t (CHP)

M L L L V T S L L L S E L P H
ATGCT TCTCTGGTG ACGAGCCTC TCCTCTGTGA GTTACCACAC
TAGGA AGGCACTAC TCTCGGAAC ACGAGACACT CATGTGTGTG

P A F L L I P C H E G O F E S V T E F G F E A D C G V A C A H
CGCAGCTCC TCTGTATCC ATGCCACCTI GAGTGTGAGC CCAGAGAAGG CTCAGTGACC TGTGTGGAC CGAGAGCTGA CCAGGCGTGG GCCTGTGCCC
CGCTCTAAGG AGGACTAAGG TACGTTGGGA CTCACAGTCC GGGCTTACG GAGTCAATGG ACAAAACCTG GCTCTCGACT GGCTACACAC CGGACACGGG

* W K D E F G V A R C F S G V K P D L S Y M P I W R F F D E R A *
ACTACAGGA CCGTCCTCTC TCGGTGGGCC GCTGCCCGTG CCGCTGGAAG CCGTCACTCT CCAACATGCC CATCTGGAGT TTCCAGATG AGGAGGGGGG
TGATATTCTT GGGAGGGAGG ACGCAGCGGG CGAGCGGGGT GGCACACTTT GGAGTGAGG GGTATTAAGG GAGACACTTC AAAGTCTTAC TCTCCCGCGG

* C Q F G P N G T H S G V G L L D K G C F A F G R A S I L T S I T
ATGCCAGCT TCGCCCATCA AGTCAGCCCA CTCCTTGTGG GAGCTGGATG ACAAAGGGCTG CCGCGCCGAG CAGAGAGGCG GCGCTGTGAC GTCCATCATC
TACGGTCGGA ACGGGCTAGT TGACATGGTG GAGGACACAC CTGGAGCCAC TCTTCCCGAC TGTTCGCGAG CGGCGCGCTC GCTCTCTGGT CGGAGAGACT CAGGTAGTAG

S A G V G G I L V V V L G V V G S I I I *
TCTGGCTGG TCGGATCTT SCGTGTGGG GTCTTGGGG TGGTCTTGG GATCGATATC TGA
AGAGCCACAC AAGCCTAAGA CGAGCAGGAC CAGAACCCGC CAGCAGAAAC CTAGAGATGAC ACT

10

Tabla 14. Ácido nucleico DHFRdm (SEQ ID NO: 46) y secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 47)

Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de DHFRdm

M V C S E N +
ATGGTTG GTTCGCTAAA
TACCAAC CAAGCGATT

~ C I V A V S Q N M G I G K N S D F F W P P F L R N E S R Y F Q R M T
CTGATCTCTC CCGTCTCTCC ACAACATGGG CATCGGCAG AGCGCGGACT TCCCTTGCGC ACCGCTCAGG AATGAATCCA GATATTCCCA GAGAACGACC
GACGTAGCAG CAGACAGGG TCTGTACCC GTAGCGCTTC ITGCCCTCGA AGCGGACCGG TGGCGAGTCC TACTTAGGT CTATAAAGT CTCTACTGG

~ T T S S V E G K Q N L V I M G G K K T W F S I P E K K R F L K G E I N
AGAACTCTT CAGTACAGG TAAACAGAT CTGTGATTA TGGTGAGAA GACCTGTTC TCCATTCTG AGAAGATAG ACCTTAAAG GGTAGATTA
CTGTGGAGAA GTGATCTTC ATCTGTGTTA GACCACTAT TCCCATCTCT CTGAGCGAG AGTAGAGAC TCTTCTTAG TGGAAATTC CCACTTAAT

~ L V L S R E L K E P F G G A K F L E R S L D D A I K L T E Q F E L
ATTAGTTCT CAGCAGAGAA CCAAGGAAC GTCCAGACA AGCTCATTT CTCTCAGAA GTCTAGATA GTCTTAAAA GTTACTGAAC AACGAGAAT
TAAATCAGA GTGCTCTTT GAGTTCCTG GAGTGTTC TCGAGTAAA GAAAGGCTT CAGATCTACT ACCGAACTT GAATGACIT TGTCTCTTA

~ A N K V D M V K I V G S S V Y K E A M N H P G H L K L F V T R I
ACCAATAAA CAGACATCG TCGGTAGCT TGGTGGCACT TCTGTTTATA AGGAAGCCAT GAATCACCCA GGCACCTTAA AACTATTGT GACAAGGATC
TCTTTATTT CATCTCLACC ACAGTATCA ACAGCCCTCA AGACAACAT TCCCTCGSTA CTAGTCCCT CCGCTAGAA TGCACAAACA CTCTCTAG

~ M Q D F E S D C F F P E I D L E K Y K L L F E Y R G V L S D Y Q E E
ATGCAGACT TGGAAAGTGA CAGCTTTT CCAAGATG ATTTCAGAA ATATGAACCT CTGCCAGAA ACCAGAGCT TCTCCGAT CTCCAGAGG
GAGTTCTGA AAGTTTCACT CTGCAAAAAN GTTCTTAAAC TAAAGTCTT TATATTGAA CAGGCTGTA TCGCTGACA AGACAGACTA GAGTCTGTCT

~ K G I K Y K F E V Y E K K E
AGAAAGCAT TAAIACAAA TTGAGATAC ATGAGAAGAA IGAT
CTTTCTCTA ACTCTCTTT AAGATCTA TACTCTCTCT ACTA

20

Listado de secuencias

<110> Seattle Children's Hospital dba Seattle Children's Research Institute Jensen, Michael C.

<120> EXPRESIÓN TRANSGÉNICA REGULADA POR FÁRMACOS

25

<130> SCRI.053WO

<150> 62/058.973

<151> 2014-10-02

30

<150> 61/977.751

<151> 2014-04-10

<150> 61/986.479

<151> 2014-04-30

35

ES 2 880 932 T3

<150> 62/089.730
 <151> 2014-12-09

 <150> 62/090.845
 5 <151> 2014-12-11

 <150> 62/088.363
 <151> 2014-12-05

 10 <160> 94

 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

 <210> 1
 15 <211> 2528
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> GMCSFss-Her2scFv-IgG4bisagra-CD28tm-41BB-Zeta-T2A-EG FRt

 <400> 1

 atgctgctgc tgggtgaccag cctgctgctg tgcgagctgc cccaccccg ctttctgctg 60
 atccccgata tccagatgac ccagtcctcg agctccctgt ccgcctctgt gggcgatagg 120
 gtcacatca cctgccgtgc cagtcaggat gtgaatactg ctgtagcctg gtatcaacag 180
 aaaccaggaa aagctccgaa actactgatt tactcggcat ccttcctcta ctctggagtc 240
 ccttctcgct tctctgggtc cagatctggg acggatttca ctctgaccat cagcagctctg 300
 cagccggaag acttcgcaac ttattactgt cagcaacatt atactactcc tcccacgttc 360
 ggacagggta ccaaggtgga gatcaaaggc agtactagcg gcggtggctc cgggggcgga 420
 tccggtgggg gcggcagcag cgaggttcag ctggtggagt ctggcggtgg cctggtgcag 480
 ccagggggct cactccgttt gtcctgtgca gcttctggct tcaacattaa agacacctat 540
 atacactggg tgcgtcaggc cccgggtaag ggcctggaat gggttgcaag gatttatcct 600
 acgaatggtt atactagata tgccgatagc gtcaagggcc gtttcactat aagcgcagac 660
 acatccaaaa acacagccta cctgcagatg aacagcctgc gtgctgagga cactgccgtc 720
 tattattggt ctagatgggg aggggacggc ttctatgcta tggactactg gggtaagga 780
 accctggtca ccgtctcgag gaatctaagt acggaccgcc ctgccccct tgcctatgt 840
 tctgggtgct ggtggtggtc ggaggcgtgc tggcctgcta cagcctgctg gtcaccgtgg 900
 ccttcatcat cttttgggtg aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacaac 960
 catttatgag accagtacaa actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag 1020
 aagaagaaga aggaggatgt gaactgcggg tgaagttagc cagaagcgcc gacgccctg 1080
 cctaccagca gggccagaat cagctgtaca acgagctgaa cctgggcaga aggaagagt 1140


```

acgacgtcct ggataagcgg agaggccggg accctgagat gggcggcaag cctcggcgga 1200
agaacccccca ggaaggcctg tataacgaac tgcagaaaga caagatggcc gaggcctaca 1260
gcgagatcgg catgaagggc gagcggaggg ggggcaaggg ccacgacggc ctgtatcagg 1320
gcctgtccac cgccaccaag gatacctacg acgccctgca catgcaggcc ctgcccccaa 1380
ggctcgaggg cggcgggagag ggcagaggaa gtcttctaac atgcggtgac gtggaggaga 1440
atccccggccc taggatgctt ctccctgggtga caagccttct gctctgtgag ttaccacacc 1500
cagcattcct cctgatccca cgcaaagtgt gtaacggaat aggtattggg gaatttaaag 1560
actcactctc cataaatgct acgaatatta aacacttcaa aaactgcacc tccatcagt 1620
gcgatctcca catcctgccg gtggcattta ggggtgactc cttcacacat actcctcctc 1680
tggatccaca ggaactggat attctgaaaa ccgtaaagga aatcacaggg tttttgctga 1740
ttcaggcttg gcctgaaaac aggacggacc tccatgcctt tgagaaccta gaaatcatac 1800
gcggcaggac caagcaacat ggtcagtttt ctcttgagct cgtcagcctg aacataacat 1860
ccttgggatt acgctccctc aaggagataa gtgatggaga tgtgataatt tcaggaaaca 1920
aaaattttgt ctatgcaaat acaataaact ggaaaaaact gtttgggacc tccggtcaga 1980
aaacccaaaat tataagcaac agaggtgaaa acagctgcaa ggccacaggc caggtctgcc 2040
atgccttgtg ctcccccgag ggctgctggg gcccgaggcc cagggactgc gtctcttgcc 2100
ggaatgtcag ccgaggcagg gaatgcgtgg acaagtgcaa ccttctggag ggtgagccaa 2160
gggagtttgt ggagaactct gagtgcatac agtgccaccc agagtgcctg cctcaggcca 2220
tgaacatcac ctgcacagga cggggaccag acaactgtat ccagtgtgcc cactacattg 2280
acggcccccct ctgcgtcaag acctgcccgg caggagtcat gggagaaaac aacaccctgg 2340
tctggaagta cgcagacgcc ggccatgtgt gccacctgtg ccatccaaac tgcacctacg 2400
gatgcactgg gccaggctct gaaggctgtc caacgaatgg gcctaagatc ccgtccatcg 2460
ccactgggat ggtggggggc ctccctcttg tctggtgggt ggccctgggg atcggcctct 2520
tcatgtga 2528

```

<210> 2
5 <211> 66
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> GMCSFRss
<400> 2

```

atgctgctgc tgggtgaccag cctgctgctg tgcgagctgc cccaccccg ctttctgctg 60
atcccc 66

```

<210> 3
15 <211> 735
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
20 <223> AND de CD19scFv
<400> 3

```

gacatccaga tgaccagac cacctccagc ctgagcgcca gcctgggoga ccgggtgacc 60
atcagctgcc gggccagcca ggacatcagc aagtaacctga actggtatca gcagaagccc 120
gacggcaccg tcaagctgct gatctaccac accagccggc tgcacagcgg cgtgcccagc 180
cggtttagcg gcagcggctc cggcaccgac tacagcctga ccatctccaa cctggaacag 240
gaagatatcg ccacctactt ttgccagcag ggcaacacac tgccctacac ctttggcggc 300
ggaacaaagc tggaaatcac cggcagcacc tccggcagcg gcaagcctgg cagcggcgag 360
ggcagcacca agggcgaggt gaagctgcag gaaagcggcc ctggcctggt ggcccccagc 420
cagagcctga gcgtgacctg caccgtgagc ggcgtagacc tgcccgaacta cggcgtgagc 480
tggatccggc agccccccag gaagggcctg gaatggctgg gcgtgatctg gggcagcgag 540
accacctact acaacagcgc cctgaagagc cggctgacca tcatcaagga caacagcaag 600
agccaggtgt tcctgaagat gaacagcctg cagaccgacg acaccgccat ctactactgc 660
gccaagcact actactacgg cggcagctac gccatggact actggggcca gggcaccagc 720
gtgaccgtga gcagc                                     735

```

5 <210> 4
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> IgG4bisagra

<400> 4
 gaatctaagt acggaccgcc ctgccccct tgccct 36

15 <210> 5
 <211> 84
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Dominio transmembrana de CD28
 <400> 5

25 atgttctggg tgctgggtgg ggtcggaggc gtgctggcct gctacagcct gctgggtcacc 60
 gtggccttca tcatcttttg ggtg 84

30 <210> 6
 <211> 126
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> ADN que codifica el dominio de 4-1BB

35 <400> 6

```

aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacac catttatgag accagtacaa 60
actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt 120
gaactg                                     126

```

40 <210> 7
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> ADN que codifica el dominio de CD3Zeta
 <400> 7

cgggtgaagt tcagcagaag cgcgcagccc cctgcctacc agcagggcca gaatcagctg 60
 tacaacgagc tgaacctggg cagaagggaa gaggtagacg tcctggataa gcggagaggc 120
 cgggaccctg agatgggagg caagcctcgg cggaagaacc cccaggaagg cctgtataac 180
 gaactgcaga aagacaagat ggccgagggc tacagcgaga tcggcatgaa gggcgagcgg 240
 aggcggggca agggccacga cggcctgtat cagggcctgt ccaccgccac caaggatacc 300
 tacgacgccc tgcacatgca ggccctgccc ccaagg 336

<210> 8
 <211> 72
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> T2A de autoescisión

<400> 8

ctcgagggcg gcggagaggg cagaggaagt cttctaacat gcggtgacgt ggaggagaat 60
 cccggcccta gg 72

<210> 9
 <211> 1074
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> EGFRt

<400> 9

atgcttctcc tgggtgacaag ccttctgctc tgtgagttac cacacccagc attcctcctg 60
 atccacgca aagtgtgtaa cggaataggt attggtgaat ttaaagactc actctccata 120
 aatgctacga atattaaaca cttcaaaaac tgcacctcca tcagtggcga tctccacatc 180
 ctgccgggtg catttagggg tgactccttc acacatactc ctctcttgga tccacaggaa 240
 ctggatattc tgaanaacgt aaaggaaatc acagggtttt tgctgattca ggcttggcct 300
 gaaaacagga cggacctcca tgcctttgag aacctagaaa tcatacgcg caggaccaag 360
 caacatggtc agttttctct tgcagtcgtc agcctgaaca taacatcctt gggattacgc 420
 tccctcaagg agataagtga tggagatgtg ataatttcag gaaacaaaaa tttgtgctat 480
 gcaaatacaa taaactggaa aaaactgttt gggacctccg gtcagaaaac caaaattata 540
 agcaacagag gtgaaaacag ctgcaaggcc acaggccagg tctgocatgc cttgtgctcc 600
 cccgagggct gctggggccc ggagcccagg gactgcgtct cttgccggaa tgtcagccga 660
 ggcaggggaat gcgtggacaa gtgcaacctt ctggagggtg agccaaggga gtttgtggag 720
 aactctgagt gcatacagtg ccaccagag tgcctgcctc aggccatgaa catcacctgc 780
 acaggacggg gaccagacaa ctgtatccag tgtgcccact acattgacgg cccccactgc 840
 gtcaagacct gcccggcagg agtcatggga gaaaacaaca ccctgggtctg gaagtacgca 900
 gacgccggcc atgtgtgcca cctgtgccat ccaaactgca cctacggatg cactgggcca 960
 ggtcttgaag gctgtccaac gaatgggcct aagatcccgt ccatcgccac tgggatggtg 1020
 ggggcccctc tcttgcctgt ggtggtggcc ctggggatcg gcctcttcat gtga 1074

<210> 10
 <211> 2529
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Proteína que tiene dominios unidos tales como GMCSFRss - CD19scFv - IgG4bisagra - CD28tm - 41BB - CD3Zeta - T2A - EGFRt

<400> 10

atgctgctgc	tggtgaccag	cctgctgctg	tgcgagctgc	cccacccgc	ctttctgctg	60
atccccgaca	tccagatgac	ccagaccacc	tccagcctga	gcgccagcct	gggcgaccgg	120
gtgaccatca	gctgccgggc	cagccaggac	atcagcaagt	acctgaactg	gtatcagcag	180
aagcccagcg	gcaccgtcaa	gctgctgata	taccacacca	gccggctgca	cagcggcgtg	240
cccagccggt	ttagcggcag	cggctccggc	accgactaca	gcctgaccat	ctccaacctg	300
gaacaggaag	atatcgccac	ctacttttgc	cagcagggca	acacactgcc	ctacaccttt	360
ggcggcgga	caaagctgga	aatcaccggc	agcacctccg	gcagcggcaa	gcctggcagc	420
ggcgagggca	gcaccaaggg	cgaggtgaag	ctgcaggaaa	gcggccctgg	cctggtggcc	480
cccagccaga	gcctgagcgt	gacctgcacc	gtgagcggcg	tgagcctgcc	cgactacggc	540
gtgagctgga	tccggcagcc	ccccaggaag	ggcctggaat	ggctgggctg	gatctggggc	600
agcgagacca	cctactacaa	cagcgccctg	aagagccggc	tgaccatcat	caaggacaa	660
agcaagagcc	aggtgttct	gaagatgaac	agcctgcaga	ccgacgacac	cgccatctac	720
tactgcgcca	agcactacta	ctacggcggc	agctacgcca	tggactactg	gggcccaggc	780
accagcgtga	ccgtgagcag	cgagagcaag	tacggaccgc	cctgcccccc	ttgccctatg	840
ttctgggtgc	tggtggtggt	cggaggcgtg	ctggcctgct	acagcctgct	ggtcaccgtg	900
gccttcatca	tcttttggtg	gaaacggggc	agaaagaaac	tcctgtatat	attcaaaca	960
ccatttatga	gaccagtaca	aactactcaa	gagggaagatg	gctgtagctg	ccgatttcca	1020
gaagaagaag	aaggaggatg	tgaactgcgg	gtgaagtcca	gcagaagcgc	cgacgcccct	1080
gcctaccagc	agggccagaa	tcagctgtac	aacgagctga	acctgggcag	aagggaagag	1140
tacgacgtcc	tggataagcg	gagaggccgg	gaccctgaga	tgggcggcaa	gcctcggcgg	1200
aagaaccccc	aggaaggcct	gtataacgaa	ctgcagaaag	acaagatggc	cgaggcctac	1260
agcgagatcg	gcatgaaggg	cgagcggagg	cggggcaagg	gccacgacgg	cctgtatcag	1320
ggcctgtcca	ccgccacca	ggatacctac	gacgccctgc	acatgcaggc	cctgccccca	1380
aggctcgagg	gcggcggaga	gggcagagga	agtcttctaa	catgcggtga	cgtggaggag	1440
aatcccggcc	ctaggatgct	tctcctggtg	acaagccttc	tgctctgtga	gttaccacac	1500
ccagcattcc	tcctgatccc	acgcaaagtg	tgtaacggaa	taggtattgg	tgaatttaaa	1560
gactcactct	ccataaatgc	tacgaatatt	aaacacttca	aaaactgcac	ctccatcagt	1620
ggcgatctcc	acatcctgcc	ggtggcattt	aggggtgact	ccttcacaca	tactcctcct	1680
ctggatccac	aggaactgga	tattctgaaa	accgtaaagg	aatcacagg	gtttttgctg	1740
attcaggctt	ggcctgaaaa	caggacggac	ctccatgcct	ttgagaacct	agaaatcata	1800
cgcggcagga	ccaagcaaca	tggtcagttt	tctcttgcat	tcgtcagcct	gaacataaca	1860
tccttgggat	tacgctccct	caaggagata	agtgatggag	atgtgataat	ttcaggaaac	1920
aaaaatttgt	gctatgcaaa	tacaataaac	tggaaaaaac	tgtttgggac	ctccggtcag	1980
aaaacaaaa	ttataagcaa	cagaggtgaa	aacagctgca	aggccacagg	ccaggctctgc	2040
catgccttgt	gctccccga	gggctgctgg	ggcccggagc	ccagggactg	cgtctcttgc	2100
cggaatgtca	gccgaggcag	ggaatgcgtg	gacaagtgca	accttctgga	gggtgagcca	2160
agggagtttg	tggagaactc	tgagtgcata	cagtgccacc	cagagtgcct	gcctcaggcc	2220
atgaacatca	cctgcacagg	acggggacca	gacaactgta	tccagtgtgc	ccactacatt	2280
gacggccccc	actgcgtcaa	gacctgcccg	gcaggagtca	tgggagaaaa	caacaccttg	2340
gtctggaagt	acgcagacgc	cggccatgtg	tgccacctgt	gccatccaaa	ctgcacctac	2400
ggatgcactg	ggccagggtct	tgaaggctgt	ccaacgaatg	ggcctaagat	cccgtccatc	2460
gccactggga	tggtgggggc	cctcctcttg	ctgctggtgg	tggccctggg	gatcggcctc	2520
ttcatgtga						2529

5

<210> 11
 <211> 842
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>
 <223> GMCSFRss - CD19scFv - IgG4bisagra - CD28tm - 41BB - CD3Zeta - T2A - EGFRt
 <400> 11

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	Asp	Val	Glu	Glu	
465					470					475					480	
Asn	Pro	Gly	Pro	Arg	Met	Leu	Leu	Leu	Val	Thr	Ser	Leu	Leu	Leu	Cys	
				485					490					495		
Glu	Leu	Pro	His	Pro	Ala	Phe	Leu	Leu	Ile	Pro	Arg	Lys	Val	Cys	Asn	
			500					505					510			
Gly	Ile	Gly	Ile	Gly	Glu	Phe	Lys	Asp	Ser	Leu	Ser	Ile	Asn	Ala	Thr	
		515					520					525				
Asn	Ile	Lys	His	Phe	Lys	Asn	Cys	Thr	Ser	Ile	Ser	Gly	Asp	Leu	His	
	530					535					540					
Ile	Leu	Pro	Val	Ala	Phe	Arg	Gly	Asp	Ser	Phe	Thr	His	Thr	Pro	Pro	
545					550					555					560	
Leu	Asp	Pro	Gln	Glu	Leu	Asp	Ile	Leu	Lys	Thr	Val	Lys	Glu	Ile	Thr	
				565					570					575		
Gly	Phe	Leu	Leu	Ile	Gln	Ala	Trp	Pro	Glu	Asn	Arg	Thr	Asp	Leu	His	
			580					585					590			
Ala	Phe	Glu	Asn	Leu	Glu	Ile	Ile	Arg	Gly	Arg	Thr	Lys	Gln	His	Gly	
		595					600					605				
Gln	Phe	Ser	Leu	Ala	Val	Val	Ser	Leu	Asn	Ile	Thr	Ser	Leu	Gly	Leu	
	610					615					620					
Arg	Ser	Leu	Lys	Glu	Ile	Ser	Asp	Gly	Asp	Val	Ile	Ile	Ser	Gly	Asn	
625					630					635	</					

Ala	Asp	Ala	Gly	His	Val	Cys	His	Leu	Cys	His	Pro	Asn	Cys	Thr	Tyr
785					790					795					800
Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	Gly	Leu	Glu	Gly	Cys	Pro	Thr	Asn	Gly	Pro	Lys
				805					810					815	
Ile	Pro	Ser	Ile	Ala	Thr	Gly	Met	Val	Gly	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu
			820					825					830		
Val	Val	Ala	Leu	Gly	Ile	Gly	Leu	Phe	Met						
		835					840								

<210> 12

<211> 15

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Enlazador de (G4S)₃

10

<400> 12

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

15 <210> 13

<211> 327

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Uniprot P0861 IgG4-Fc

<400> 13

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

5

<210> 14
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>
 <223> Dominio transmembrana de CD28

<400> 14

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	Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	Leu	Leu	His	Ser	Asp	Tyr	Met
			180					185					190		
Asn	Met	Thr	Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Pro	Thr	Arg	Lys	His	Tyr	Gln	Pro
		195					200					205			
Tyr	Ala	Pro	Pro	Arg	Asp	Phe	Ala	Ala	Tyr	Arg	Ser				
	210					215					220				

<210> 15
 <211> 240
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

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

10 <400> 15

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

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

<210> 16
 <211> 164
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Isoforma 3 de CD3 Zeta humana

<400> 16

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> 17
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> IgG1 humana

 10 <400> 17

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

 <210> 18
 15 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> IgG2 humana

 <400> 18

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

 25 <210> 19
 <211> 61
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> IgG3 humana

 <400> 19

 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
 35

 <210> 20
 <211> 12
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> IgG4 humana

 45 <400> 20

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

 <210> 21
 50 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

[illegible]

<220>
 <223> oJ02653

 <400> 27
 5 cgaccagcaa ccatagtcc 19

 <210> 28
 <211> 18
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oJ02654

 15 <400> 28
 tagcggtttg actcacgg 18

 <210> 29
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oJ02655
 25
 <400> 29
 gcaggagct agaacgattc 20

 <210> 30
 30 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 35 <223> oJ02656

 <400> 30
 attgtctggt atagtgcagc ag 22

 40 <210> 31
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 45 <220>
 <223> oJ02657

 <400> 31
 50 tcgcaacggg ttgccc 16
 <210> 32
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 55 <220>
 <223> oJ02658

 <400> 32
 60 aggaagatat cgccacctac t 21

 <210> 33
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65

<220>
 <223> oJ02601

 5 <400> 33
 cgggtgaagt tcagcagaag 20

 <210> 34
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oJ02735

 15 <400> 34
 actgtgtttg ctgacgcaac 20

 <210> 35
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oJ02715
 25
 <400> 35
 atgcttctcc tggcgacaag 20

 <210> 36
 30 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Enlazador de IgG4 humana modificada
 35
 <400> 36

 Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5

 40 <210> 37
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 45 <220>
 <223> IgG4 humana modificada
 <400> 37

 Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10
 50

 <210> 38
 <211> 13
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> IgG4 humana modificada
 60 <400> 38

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

5 <210> 39
<211> 2586
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> TamR-tf (HEA3)
<400> 39

```

atggtgtcca agctgtccca gctgcagaca gaactgctgg cagcactgct ggaaagcggc 60
ctgagcaaaag aggccctgat tcaggcactc ggcgaacctg gaccttatct gctcgctggc 120
gaaggccctc tggataaggg cgagagctgt ggcggaggaa gaggagagct ggccgagctg 180
cctaaccggcc tgggcgagac aagaggcagc gaggacgaga cagacgacga cggcgaggac 240
ttcaccctccc ccacctcgaa agagctggaa aacctgagcc ccgaggaagc cggccaccag 300
aaagccgtgg tggagacact gctgcaggaa gatccctggc gggtcgcca gatggtcaag 360
agctacctgc agcagcaca catccccag cgggaggtgg tggacaccac cggcctgaac 420
cagagccacc tgagccagca cctgaacaag ggcaccccc tgaaaacca gaagagagcc 480
gccctgtaca cttggtacgt gcggaagcag agagaggtgg ccagcagtt tacacacgcc 540
ggccagggcg gcctgatcga ggaacctacc ggcgacgagc tgcccaccaa gaagggcaga 600
cggaccccggt ttaagtgggg ccctgcatct cagcagatcc tgttccaggc ctacgagcgg 660
cagaagaacc ccagcaaaga ggaacgggag acactggtgg aagagtgcaa ccgggccgag 720
tgcatccaga gaggcgtgag cccttctcag gctcagggcc tcggcagcaa tctggtcacc 780
gaagtgcggg tgtacaattg gttcgccaac cggcggaag aggaagcctt ccggcacaag 840
ctgtctgctg gcgatatgag agccgccaac ctgtggccca gcccctgat gatcaagcgg 900
agcaagaaga acagcctggc cctgagcctg accgccgatc agatggtgtc cgctctgctg 960
gacgccgagc cccctatcct gtacagcgag tacgacccca ccagaccctt cagcgaggcc 1020
agcatgatgg gcctgctgac caacctggcc gaccgggagc tgggtgcacat gatcaactgg 1080
gccaagcggg tgcccggctt cgtggacctg accctgcacg accaggtcca cctgctggaa 1140
tgtgcctggc tggaaatcct gatgatcggc ctggtgtgga gaagcatgga acaccccggc 1200
aagctgctgt tcgcccccaa cctgctcctg gaccggaaac agggaaagtg cgtggagggg 1260
atggtggaga tcttcgacat gctgctggcc acctccagcc ggttccggat gatgaacctg 1320
cagggcgagg aattcgtgtg cctgaagtcc atcatcctgc tgaacagcgg cgtgtacacc 1380
ttcctgtcat ccacctgaa gtccctggaa gagaaggacc acatccaccg ggtgctggac 1440
aagatcaccc acacctgat ccacctgat gccaaaggct gcctgacact ccagcagcag 1500
caccagagac tggcccagct gctgctgatc ctgagccaca tccggcacat gagcaacaag 1560
cggatggaac acctgtacag catgaagtgc aagaacgtgg tgcccctgta cgacctgctg 1620
ctcgagatgc tggatgcca cagactgcac gccctacaa gcagaggcgg agccagcgtg 1680
gaggaaaccg accagtctca cctggccacc gccggcagca caagcagcca cagcctgcag 1740
aagtactaca tcaccggcga ggccgaggga ttccctgcca ccgtggagtt ccagtacctg 1800
cccagacaccg acgaccggca ccggatcgag gaaaagcggg agcggaccta cgagacattc 1860
aagagcatca tgaagaagtc ccccttcagc ggccccaccg atcccagacc cccccctaga 1920
agaatcgccg tgcccagcag atctagcgcc agcgtgccc agcctgcccc ccagccctac 1980
cctttcacca gcagcctgag caccatcaac tacgacgagt tccctaccat ggtgttcccc 2040
agcggccaga tctctcaggc ctctgctctg gcacctgctc cacctcaggt gctgcctcag 2100
gcccctgctc cagccccagc ccctgccatg gtgtctgcac tggcccaggc tccagctcct 2160
gtgcctgtgc tggcccctgg acctcctcag gctgtggccc ctctgcccc taaacctacc 2220
caggccgggg agggaaact gtctgaggcc ctgctgcagc tccagttcga cgacgaggat 2280
ctgggagcac tgctgggcaa tagcaccgac ccgcccgtgt ttaccgacct ggcctccgtg 2340
gacaacagcg agttccagca gctcctcaac cagggcaccc ctgtcgcccc acacaccacc 2400
gagcccatgc tgatggaata ccccgaggcc atcaccagac tgggtcacagg cggccagagg 2460
cctccagatc cagcaccagc tccactggga gccctggccc tgcctaattg gctgctgtct 2520

ggcgacgagg acttctccag cattgccgac atggacttca gcgccctgct gtcccagatc 2580
agcagc
2586

```

<210> 40
<211> 828

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
5 <223> TamR-tf (HEA3)

<400> 40

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

				405					410					415		
Cys	Val	Glu	Gly	Met	Val	Glu	Ile	Phe	Asp	Met	Leu	Leu	Ala	Thr	Ser	
			420					425					430			
Ser	Arg	Phe	Arg	Met	Met	Asn	Leu	Gln	Gly	Glu	Glu	Phe	Val	Cys	Leu	
		435					440					445				
Lys	Ser	Ile	Ile	Leu	Leu	Asn	Ser	Gly	Val	Tyr	Thr	Phe	Leu	Ser	Ser	
	450					455					460					
Thr	Leu	Lys	Ser	Leu	Glu	Glu	Lys	Asp	His	Ile	His	Arg	Val	Leu	Asp	
465					470					475					480	
Lys	Ile	Thr	Asp	Thr	Leu	Ile	His	Leu	Met	Ala	Lys	Ala	Gly	Leu	Thr	
			485						490					495		
Leu	Gln	Gln	Gln	His	Gln	Arg	Leu	Ala	Gln	Leu	Leu	Leu	Ile	Leu	Ser	
			500					505					510			
His	Ile	Arg	His	Met	Ser	Asn	Lys	Arg	Met	Glu	His	Leu	Tyr	Ser	Met	
	515						520					525				
Lys	Cys	Lys	Asn	Val	Val	Pro	Leu	Tyr	Asp	Leu	Leu	Glu	Met	Leu		
	530					535					540					
Asp	Ala	His	Arg	Leu	His	Ala	Pro	Thr	Ser	Arg	Gly	Gly	Ala	Ser	Val	
545					550					555					560	
Glu	Glu	Phe	Gln	Tyr	Leu	Pro	Asp	Thr	Asp	Arg	His	Arg	Ile	Glu		
			565						570					575		
Glu	Lys	Arg	Lys	Arg	Thr	Tyr	Glu	Thr	Phe	Lys	Ser	Ile	Met	Lys	Lys	
			580					585					590			
Ser	Pro	Phe	Ser	Gly	Pro	Thr	Asp	Pro	Arg	Pro	Pro	Pro	Arg	Arg	Ile	
		595					600					605				
Ala	Val	Pro	Ser	Arg	Ser	Ser	Ala	Ser	Val	Pro	Lys	Pro	Ala	Pro	Gln	
	610					615					620					
Pro	Tyr	Pro	Phe	Thr	Ser	Ser	Leu	Ser	Thr	Ile	Asn	Tyr	Asp	Glu	Phe	
625					630					635					640	
Pro	Thr	Met	Val	Phe	Pro	Ser	Gly	Gln	Ile	Ser	Gln	Ala	Ser	Ala	Leu	
			645						650					655		
Ala	Pro	Ala	Pro	Pro	Gln	Val	Leu	Pro	Gln	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	
			660					665					670			
Ala	Pro	Ala	Met	Val	Ser	Ala	Leu	Ala	Gln	Ala	Pro	Ala	Pro	Val	Pro	
		675					680					685				
Val	Leu	Ala	Pro	Gly	Pro	Pro	Gln	Ala	Val	Ala	Pro	Pro	Ala	Pro	Lys	
	690					695					700					
Pro	Thr	Gln	Ala	Gly	Glu	Gly	Thr	Leu	Ser	Glu	Ala	Leu	Leu	Gln	Leu	
705					710					715					720	
Gln	Phe	Asp	Asp	Glu	Asp	Leu	Gly	Ala	Leu	Leu	Gly	Asn	Ser	Thr	Asp	
			725						730					735		
Pro	Ala	Val	Phe	Thr	Asp	Leu	Ala	Ser	Val	Asp	Asn	Ser	Glu	Phe	Gln	
			740					745					750			
Gln	Leu	Leu	Asn	Gln	Gly	Ile	Pro	Val	Ala	Pro	His	Thr	Thr	Glu	Pro	
		755					760					765				
Met	Leu	Met	Glu	Tyr	Pro	Glu	Ala	Ile	Thr	Arg	Leu	Val	Thr	Gly	Ala	
	770					775					780					
Gln	Arg	Pro	Pro	Asp	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Leu	Gly	Ala	Pro	Gly	Leu	
785					790					795					800	
Pro	Asn	Gly	Leu	Leu	Ser	Gly	Asp	Glu	Asp	Phe	Ser	Ser	Ile	Ala	Asp	
			805						810					815		
Met	Asp	Phe	Ser	Ala	Leu	Leu	Ser	Gln	Ile	Ser	Ser					
			820					825								

<210> 41
 <211> 119
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 7xHBD/mEF1-alfa

<400> 41

5

tagttaataa tctacaatag ttaataatct acaatagtta ataatctaca atagttaata 60
atctacaata gttaataatc tacaatagtt aataatctac aatagttaat aatctacaa 119

<210> 42

<211> 2586

10

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TamR-tf (HEA4)

15

<400> 42

atggtgtcca agctgtccca gctgcagaca gaactgctgg cagcactgct ggaaagcggc 60
ctgagcaaag aggcacctgat tcaggcactc ggcggaacctg gaccttatct gctcgctggc 120
gaaggccctc tggataaggg cgagagctgt ggcgaggaga gaggagagct ggccgagctg 180
cctaacggcc tgggcgagac aagaggcagc gaggacgaga cagacgacga cggcgaggac 240
ttcaccccc ccattcctgaa agagctggaa aacctgagcc ccgaggaagc cgcccaccag 300
aaagccgtgg tggagacact gctgcaggaa gatccctggc gggtcgccaa gatggtcaag 360
agctacctgc agcagcacia catccccag cgggaggtgg tggacaccac cggcctgaac 420
cagagccacc tgagccagca cctgaacaag ggcacccccca tgaaaaccca gaagagagcc 480
gccctgtaca cttggtacgt gcggaagcag agagaggtgg ccagcagtt tacacacgcc 540
ggccaggggc gcctgatcga ggaacctacc ggcgacgagc tgcccaccaa gaagggcaga 600
cggaaccggg ttaagtgggg ccctgcatct cagcagatcc tgttccaggc ctacgagcgg 660
cagaagaacc ccagcaaaga ggaacgggag acactggtgg aagagtgcaa ccgggcccag 720
tgcatccaga gaggcgtgag cccttctcag gctcaggggc tcggcagcaa tctggtcacc 780
gaagtgcggg tgtacaattg gttcgccaac cggcggaag aggaagcctt ccggcacaag 840
ctgtctgctg gcgatatgag agccgccaac ctgtggccca gccccctgat gatcaagcgg 900
agcaagaaga acagcctggc cctgagcctg accgcccgatc agatggtgtc cgctctgctg 960
gacgcccagc ccctatcct gtacagcgag tacgacccca ccagaccctt cagcagggcc 1020
agcatgatgg gcctgctgac caacctggcc gaccgggagc tgggtgcacat gatcaactgg 1080
gccaagcggg tgcccggctt cgtggacctg accctgcacg accaggtcca cctgctggaa 1140
tgtgcctggc tggaaatcct gatgatcggc ctctgtgtga gaagcatgga acaccccgtg 1200
aagctgctgt tcgcccccaa cctgctcctg gaccggaacc agggaaagtg cgtggaggggc 1260
atggtggaga tcttcgacat gctgctggcc acctccagcc ggttccggat gatgaacctg 1320
cagggcgagg aattcgtgtg cctgaagtcc atcatcctgc tgaacagcgg cgtgtacacc 1380
ttcctgtcat ccacctgaa gtccctggaa gagaaggacc acatccaccg ggtgctggac 1440
aagatcaccg acacctgat ccacctgatg gccaaaggctg gcctgacact ccagcagcag 1500
caccagagac tggcccagct gctgctgatc ctgagccaca tccggcacat gagcaacaag 1560
ggaatggaac acctgtacag catgaagtgc acgaacgtgg tggccctgta cgacctgctg 1620
ctcgaggctg ccgatgccc cagactgcca gcccctacaa gcagaggcgg agccagcgtg 1680
gaggaaccg accagtctca cctggccacc gcccgcagca caagcagcca cagcctgcag 1740
aagtactaca tcaccggcga ggccgaggga ttccctgcca ccgtggagtt ccagtacctg 1800
cccagacacc acgaccggca ccggatcgag gaaaagcggg agcggaccta cgagacattc 1860
aagagcatca tgaagaagt ccccttcagc ggccccaccg atcccagacc cccccctaga 1920
agaatcgccg tgcccagcag atctagcggc agcgtgccc agcctgcccc ccagccctac 1980
cctttcacca gcagcctgag caccatcaac tacgacgagt tccctaccat ggtgttcccc 2040
agcggccaga tctctcaggc ctctgctctg gcacctgctc cacctcaggt gctgcctcag 2100
gccccctgctc cagccccagc ccctgccatg gtgtctgcac tggcccaggc tccagctcct 2160
gtgcctgtgc tggcccctgg acctcctcag gctgtggccc ctccctgcccc taaacctacc 2220
caggccgggg agggaaacact gtctgaggcc ctgctgcagc tccagttcga cgacgaggat 2280
ctgggagcac tgctgggcaa tagcaccgac ccgcctgtgt ttaccgacct ggcctccgtg 2340
gacaacagcg agttccagca gctcctcaac caggggcatcc ctgtcgcccc acacaccacc 2400
gagcccatgc tgatggaata ccccagggcc atcaccagac tgggtcacagg cgcccagagg 2460
cctccagatc cagcaccagc tccactggga gcccctggcc tgccctaatgg gctgctgtct 2520
ggcgacgagg acttctccag cattgcccagc atggacttca gcgccctgct gtcccagatc 2580
agcagc 2586

<210> 43
<211> 862
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5

<220>
<223> TamR-tf (HEA4)
<400> 43

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

465					470					475				480	
Lys	Ile	Thr	Asp	Thr	Leu	Ile	His	Leu	Met	Ala	Lys	Ala	Gly	Leu	Thr
				485					490					495	
Leu	Gln	Gln	Gln	His	Gln	Arg	Leu	Ala	Gln	Leu	Leu	Leu	Ile	Leu	Ser
			500					505					510		
His	Ile	Arg	His	Met	Ser	Asn	Lys	Gly	Met	Glu	His	Leu	Tyr	Ser	Met
		515					520					525			
Lys	Cys	Lys	Asn	Val	Val	Pro	Leu	Tyr	Asp	Leu	Leu	Leu	Glu	Ala	Ala
	530					535					540				
Asp	Ala	His	Arg	Leu	His	Ala	Pro	Thr	Ser	Arg	Gly	Gly	Ala	Ser	Val
545					550					555					560
Glu	Glu	Thr	Asp	Gln	Ser	His	Leu	Ala	Thr	Ala	Gly	Ser	Thr	Ser	Ser
			565						570					575	
His	Ser	Leu	Gln	Lys	Tyr	Tyr	Ile	Thr	Gly	Glu	Ala	Glu	Gly	Phe	Pro
			580					585					590		
Ala	Thr	Val	Glu	Phe	Gln	Tyr	Leu	Pro	Asp	Thr	Asp	Asp	Arg	His	Arg
		595					600					605			
Ile	Glu	Glu	Lys	Arg	Lys	Arg	Thr	Tyr	Glu	Thr	Phe	Lys	Ser	Ile	Met
	610					615					620				
Lys	Lys	Ser	Pro	Phe	Ser	Gly	Pro	Thr	Asp	Pro	Arg	Pro	Pro	Pro	Arg
625				630						635					640
Arg	Ile	Ala	Val	Pro	Ser	Arg	Ser	Ser	Ala	Ser	Val	Pro	Lys	Pro	Ala
			645						650					655	
Pro	Gln	Pro	Tyr	Pro	Phe	Thr	Ser	Ser	Leu	Ser	Thr	Ile	Asn	Tyr	Asp
			660					665					670		
Glu	Phe	Pro	Thr	Met	Val	Phe	Pro	Ser	Gly	Gln	Ile	Ser	Gln	Ala	Ser
		675					680					685			
Ala	Leu	Ala	Pro	Ala	Pro	Pro	Gln	Val	Leu	Pro	Gln	Ala	Pro	Ala	Pro
	690					695					700				
Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Met	Val	Ser	Ala	Leu	Ala	Gln	Ala	Pro	Ala	Pro
705				710						715					720
Val	Pro	Val	Leu	Ala	Pro	Gly	Pro	Pro	Gln	Ala	Val	Ala	Pro	Pro	Ala
			725						730					735	
Pro	Lys	Pro	Thr	Gln	Ala	Gly	Glu	Gly	Thr	Leu	Ser	Glu	Ala	Leu	Leu
			740					745					750		
Gln	Leu	Gln	Phe	Asp	Asp	Glu	Asp	Leu	Gly	Ala	Leu	Leu	Gly	Asn	Ser
		755					760					765			
Thr	Asp	Pro	Ala	Val	Phe	Thr	Asp	Leu	Ala	Ser	Val	Asp	Asn	Ser	Glu
	770					775					780				
Phe	Gln	Gln	Leu	Leu	Asn	Gln	Gly	Ile	Pro	Val	Ala	Pro	His	Thr	Thr
785					790					795					800
Glu	Pro	Met	Leu	Met	Glu	Tyr	Pro	Glu	Ala	Ile	Thr	Arg	Leu	Val	Thr
			805						810					815	
Gly	Ala	Gln	Arg	Pro	Pro	Asp	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Leu	Gly	Ala	Pro
			820					825					830		
Gly	Leu	Pro	Asn	Gly	Leu	Leu	Ser	Gly	Asp	Glu	Asp	Phe	Ser	Ser	Ile
	835						840					845			
Ala	Asp	Met	Asp	Phe	Ser	Ala	Leu	Leu	Ser	Gln	Ile	Ser	Ser		
	850					855					860				

<210> 44
 <211> 408
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Her2t
 10 <400> 44

```

atgcttctcc tggtgacaag ccttctgctc tgtgagttac cacaccagc attcctcctg 60
atcccatgcc accctgagtg tcagcccccag aatggctcag tgacctgttt tggaccggag 120
gctgaccagt gtgtggcctg tgcccactat aaggaccctc ccttctgcgt ggcccgtctg 180

cccagcgggtg tgaaacctga cctctcctac atgcccctct ggaagtttcc agatgaggag 240
ggcgcatgcc agccttgccc catcaactgc accactcct gtgtggacct ggatgacaag 300
ggctgccccg ccgagcagag agccagccct ctgacgtcca tcctctctgc ggtggttggc 360
attctgctgg tcgtggtctt ggggggtggtc tttgggatcc tcctctga 408

```

<210> 45
 <211> 135
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Her2t

<400> 45

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> 46
 <211> 561
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> DHFRdm

<400> 46

```

atggttgggtt cgctaaactg catcgtcgct gtgtcccaga acatgggcat cggcaagaac 60
ggggacttcc cctggccacc gctcaggaat gaatccagat atttccagag aatgaccaca 120
acctcttcag tagaaggtaa acagaatctg gtgattatgg gtaagaagac ctggttctcc 180
attcctgaga agaatcgacc tttaaagggt agaattaatt tagttctcag cagagaactc 240
aaggaacctc cacaaggagc tcattttctt tccagaagtc tagatgatgc cttaaaactt 300
actgaacaac cagaattagc aaataaagta gacatggtct ggatagttgg tggcagttct 360
gtttataagg aagccatgaa tcacccaggc catcttaaac tatttgtgac aaggatcatg 420
caagactttg aaagtgcacac gttttttcca gaaattgatt tggagaaata taaacttctg 480
ccagaatacc caggtgttct ctctgatgtc caggaggaga aaggcattaa gtacaaattt 540
gaagtatatg agaagaatga t

```

<210> 47
 <211> 187
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> DHFRdm

<400> 47

10

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

<210> 48

15 <400> 48
 000

<210> 49

20 <400> 49
 000

<210> 50

25 <400> 50
 000

<210> 51

30 <400> 51
 000

<210> 52

35 <400> 52
 000

<210> 53

ES 2 880 932 T3

<400> 53
 000
 <210> 54
 5
 <400> 54
 000
 <210> 55
 10
 <400> 55
 000
 <210> 56
 15
 <400> 56
 000
 <210> 57
 20
 <400> 57
 000
 <210> 58
 25
 <400> 58
 000
 <210> 59
 30
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35
 <223> Dominio de CH3
 <400> 59
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val
 40
 <210> 60
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> Dominio de bisagra
 <400> 60

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

5 <210> 61
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Dominio de CH2

<400> 61

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

15 <210> 62
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Dominio de proteína de CH3

<400> 62

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	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							

<210> 63

30 <400> 63
000

<210> 64

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

5 <220>
 <223> Péptido señal
 <400> 64

Met Leu Arg Leu Leu Leu Ala Leu Asn Leu Phe Pro
 1 5 10

10 <210> 65
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Dominio extracelular

20 <400> 65

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

25 <210> 66
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Dominio transmembrana

<400> 66

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

35 <210> 67
 <211> 50
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio intracelular

<400> 67

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

<210> 68

<220>

10 <223> Péptido señal

<400> 68

000

15 <210> 69

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Péptido señal

<400> 69

Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu
 1 5 10 15
 Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser
 20

25

<210> 70

<211> 166

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio extracelular

35 <400> 70

```

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

```

5 <210> 71
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Dominio transmembrana
 <400> 71

```

Ile Ile Ser Phe Phe Leu Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu
 1          5          10          15
Leu Phe Phe Leu Thr Leu Arg Phe Ser Val Val
          20          25

```

15 <210> 72
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Dominio intracelular

```

<400> 72
Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
 1          5          10          15
Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
          20          25          30
Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
          35          40

```

25 <210> 73
 <211> 21
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido señal

<400> 73

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
 20

<210> 74
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Dominio extracelular

15 <400> 74

Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys
 1 5

20 <210> 75
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Dominio transmembrana

<400> 75

Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu
 1 5 10 15

30 **Thr Ala Leu Phe Leu**
 20

<210> 76
 <211> 113
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Dominio intracelular

40 <400> 76

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

Arg

<210> 77
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> ITAM I

<400> 77

Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn
1				5					10					15	
Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg			
			20					25							

<210> 78
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> ITAM 2

<400> 78

Pro	Gln	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln
1				5					10					15	
Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met			
			20					25							

<210> 79
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> ITAM 3

<400> 79

Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser
1				5					10					15	
Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln			
			20					25							

ES 2 880 932 T3

<210> 80
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Líder
 <400> 80
 10
 atgcttctcc tggtgacaag ccttctgctc tgtgagttac cacacccagc attcctcctg 60
 atccca 66
 <210> 81
 <211> 734
 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Her2scFV
 20
 <400> 81
 gatatccaga tgacccagtc cccgagctcc ctgtccgcct ctgtgggcga tagggtcacc 60
 atcacctgcc gtgccagtca ggatgtgaat actgctgtag cctgggtatca acagaaacca 120
 ggaaaagctc cgaaactact gatttactcg gcacccctcc tctactctgg agtcccttct 180
 cgcttctctg gttccagatc tgggacggat ttcactctga ccatcagcag tctgcagccg 240
 gaagacttct caacttatta ctgtcagcaa cattatacta ctccctccac gttcggacag 300
 ggtaccaagg tggagatcaa aggcagtact agcggcggtg gctccggggg cggatccggt 360
 gggggcggca gcagcgaggt tcagctggtg gagtctggcg gtggcctggt gcagccaggg 420
 ggctcactcc gtttgtcctg tgcagcttct ggcttcaaca ttaaagacac ctatatacac 480
 tgggtgctgc agggccccgg taagggcctg gaatgggttg caaggattta tcctacgaat 540
 ggttatacta gatatgccga tagcgtcaag ggccggttca ctataagcgc agacacatcc 600
 aaaaacacag cctacctgca gatgaacagc ctgctgtgctg aggacactgc cgtctattat 660
 tgttctagat ggggagggga cggcttctat gctatggact actgggggtca aggaaccctg 720
 gtcaccgtct cgag 734
 25
 <210> 82
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Espaciador de bisagra
 <400> 82
 gagagcaagt acggaccgcc ctgccccct tgccct 36
 35
 <210> 83
 <211> 84
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> CD28tm
 <400> 83
 45
 atgttctggg tgctgggtgt ggtcggaggc gtgctggcct gctacagcct gctggtcacc 60
 gtggccttca tcatcttttg ggtg 84
 <210> 84
 <211> 126

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> 4-1BB

<400> 84

```

aaacgggggca gaaagaaact cctgtatatata ttcaaacaac catttatgag accagtacaa 60
actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt 120
gaactg                                           126

```

10 <210> 85
<211> 336
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> CD3 zeta

<400> 85

```

cgggtgaagt tcagcagaag cgccgacgcc cctgcctacc agcagggcca gaatcagctg 60
tacaacgagc tgaacctggg cagaagggaa gagtacgacg tcctggataa gcggagaggc 120
cgggaccctg agatgggagg caagcctcgg cggaagaacc cccaggaagg cctgtataac 180
gaactgcaga aagacaagat ggccgaggcc tacagcgaga tcggcatgaa gggcgagcgg 240
aggcggggca agggccacga cggcctgtat cagggcctgt ccaccgccac caaggatacc 300
tacgacgccc tgcacatgca ggccctgccc ccaagg                                           336

```

20 <210> 86
<211> 72
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> T2A

30 <400> 86

```

ctcgagggcg gcggagaggg cagaggaagt cttctaacat gcggtgacgt ggaggagaat 60
cccggcccta gg                                           72

```

35 <210> 87
<211> 1074
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> tEGFR

40

<400> 87

```

atgcttctcc tggtgacaag ccttctgctc tgtgagttac cacaccagc attcctcctg 60
atcccacgca aagtgtgtaa cggaataggc attgggtgaat ttaaagactc actctccata 120
aatgctacga atattaaaca cttcaaaaac tgcacctcca tcagtggcga tctccacatc 180
ctgccggtgg catttagggg tgactccttc acacatactc ctctcttgga tccacaggaa 240
ctggatatct tgaaaaccgt aaaggaaatc acagggtttt tgctgattca ggcttggcct 300
gaaaacagga cgacacctca tgcctttgag aacctagaaa tcatacgcgg caggaccaag 360

```



```

caacatggtc agttttctct tgcagtcgtc agcctgaaca taacatcctt gggattacgc 420
tcctcaagg agataagtga tggagatgtg ataatttcag gaaacaaaaa tttgtgctat 480
gcaaatacaa taaactggaa aaaactgttt gggacctccg gtcagaaaac caaaattata 540
agcaacagag gtgaaaacag ctgcaaggcc acaggccagg tctgccatgc cttgtgctcc 600
cccgagggtc gctggggccc ggagcccagg gactgcgtct cttgccggaa tgtcagccga 660
ggcaggggat gcgtggacaa gtgcaacctt ctggagggtg agccaagga gtttgtggag 720
aactctgagt gcatacagt ccacccagag tgcctgcctc aggccatgaa catcacctgc 780
acaggacggg gaccagacaa ctgtatccag tgtgccact acattgacgg cccccactgc 840
gtcaagacct gcccggcagg agtcatggga gaaaacaaca ccctggtctg gaagtacgca 900
gacgccggcc atgtgtgcc cctgtgccat ccaaactgca cctacggatg cactgggcca 960
ggtcttgaag gctgtccaac gaatgggcct aagatcccg ccacgccac tgggatgggtg 1020
ggggccctcc tcttgtctgt ggtggtggcc ctggggatcg gcctcttcat gtga 1074

```

5 <210> 88
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> ScFv humanizado que comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de CDRL1
 <400> 88

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn
 1 5 10

15 <210> 89
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> CDRL2

25 <400> 89

Ser Arg Leu His Ser Gly Val
 1 5

30 <210> 90
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> CDRL3

<400> 90

Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly
 1 5

40 <210> 91
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> CDRH1

<400> 91

```

                                Asp Tyr Gly Val Ser
                                1           5

5      <210> 92
      <211> 16
      <212> PRT
      <213> Secuencia Artificial

10     <220>
      <223> CDRH2

      <400> 92

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

      <210> 93
      <211> 7
      <212> PRT
      <213> Secuencia Artificial

      <220>
      <223> CDRH3

25     <400> 93

                                Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
                                1           5

30     <210> 94
      <211> 18
      <212> PRT
      <213> Secuencia Artificial

35     <220>
      <223> Enlazador flexible entre las cadenas de VH y VL en el scFv

      <400> 94

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

40     Lys Gly

```

REIVINDICACIONES

1. Un sistema para la expresión inducible de un polinucleótido que comprende:

- 5 a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor inducible por tamoxifeno, un metabolito de tamoxifeno o un análogo de tamoxifeno, en el que el primer promotor comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 41, y en el que el primer promotor está operativamente unido a un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), en el que el CAR comprende:
- 10 un dominio de unión al ligando específico para un ligando, en el que el ligando es una molécula específica del tumor, una molécula viral o una molécula expresada en una población de células diana, en la que el ligando puede provocar el reconocimiento, modulación, inhibición y/o eliminación por un linfocito al interactuar con el dominio de unión al ligando,
- 15 un espaciador de polipéptidos,
un dominio transmembrana,
un dominio de señalización intracelular;
- b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor constitutivo, tal como un promotor de EF1 α , en el que el segundo promotor está operativamente unido a un ácido nucleico que codifica un activador transcripcional para el primer promotor y comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40;
- 20 c) tamoxifeno, un metabolito del tamoxifeno o un análogo del tamoxifeno; y
d) un estimulador de activación que comprende un anti-CD3 y/o un anti-CD28.

25 2. El sistema de la reivindicación 1, en el que el primer ácido nucleico comprende además un primer vector y el segundo ácido nucleico comprende además un segundo vector.

3. El sistema de la reivindicación 2, en el que el primer y segundo vectores están empaquetados en un vector viral, tal como un lentivirus.

30 4. El sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el primer ácido nucleico o el segundo ácido nucleico comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica un marcador seleccionable.

5. El sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el primer promotor está en una orientación opuesta al segundo promotor.

35 6. El sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la molécula específica del tumor se selecciona del grupo que consiste en CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, CE7, EGFR, hB7H3, mesotelina, c-Met, PSMA, Her2, GD-2 y MAGE A3 TCR.

40 7. El sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el espaciador comprende una longitud de espaciador optimizada para una mayor proliferación de células T y/o producción de citocinas en respuesta al ligando en comparación con un receptor quimérico de referencia.

45 8. El sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende además una célula huésped que comprende el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico.

9. El sistema de la reivindicación 8, en el que la célula huésped se selecciona del grupo que consiste en: (i) una célula linfocítica T citotóxica CD8⁺ seleccionada del grupo que consiste en una célula T CD8⁺ no modificada, una célula T CD8⁺ de memoria central, una célula T CD8⁺ de memoria efectora y una célula T CD8⁺ a granel; (ii) una célula linfocítica T colaboradora CD4⁺ seleccionada del grupo que consiste en una célula T CD4⁺ no modificada, una célula T CD4⁺ de memoria central, una célula T CD4⁺ de memoria efectora y una célula T CD4⁺ a granel; (iii) una célula T precursora; y (iv) una célula madre hematopoyética.

50 10. Un método *in vitro* para preparar una célula huésped que comprende el sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende:

- a) proporcionar el sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7;
- b) introducir el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico en una población de linfocitos T aislada separada;
- c) expandir la población de linfocitos T *in vitro*; y
- 60 d) cultivar la población de linfocitos T en presencia de (i) el tamoxifeno, el metabolito del tamoxifeno o el análogo del tamoxifeno, (ii) el estimulador activador que comprende un anti-CD3 y/o un anti-CD28, y (iii) al menos una citocina homeostática, de modo que la población de linfocitos T se expanda lo suficiente para su uso como una infusión de células.

65 11. El método de la reivindicación 10, en el que la población de linfocitos T comprende una célula seleccionada del grupo que consiste en: (i) una célula linfocítica T citotóxica CD8⁺ seleccionada del grupo que consiste en una célula

T CD8+ no modificada, una célula T CD8+ de memoria central, una célula T CD8+ de memoria efectora y una célula T CD8+ a granel; (ii) una célula linfocítica T colaboradora CD4+ seleccionada del grupo que consiste en una célula T CD4+ no modificada, una célula T CD4+ de memoria central, una célula T CD4+ de memoria efectora y una célula T CD4+ a granel; (iii) una célula T precursora; y (iv) una célula madre hematopoyética.

5 12. Una célula huésped para su uso en el tratamiento de un cáncer o una infección viral, en la que la célula huésped comprende el sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

10 13. La célula huésped para el uso de la reivindicación 12, en la que el cáncer es un tumor sólido, tal como un cáncer de mama, cáncer de cerebro, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer de próstata o cáncer de ovario o una neoplasia maligna hematológica.

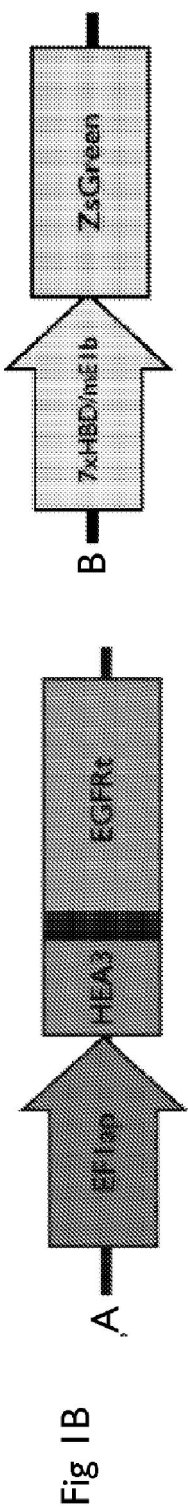
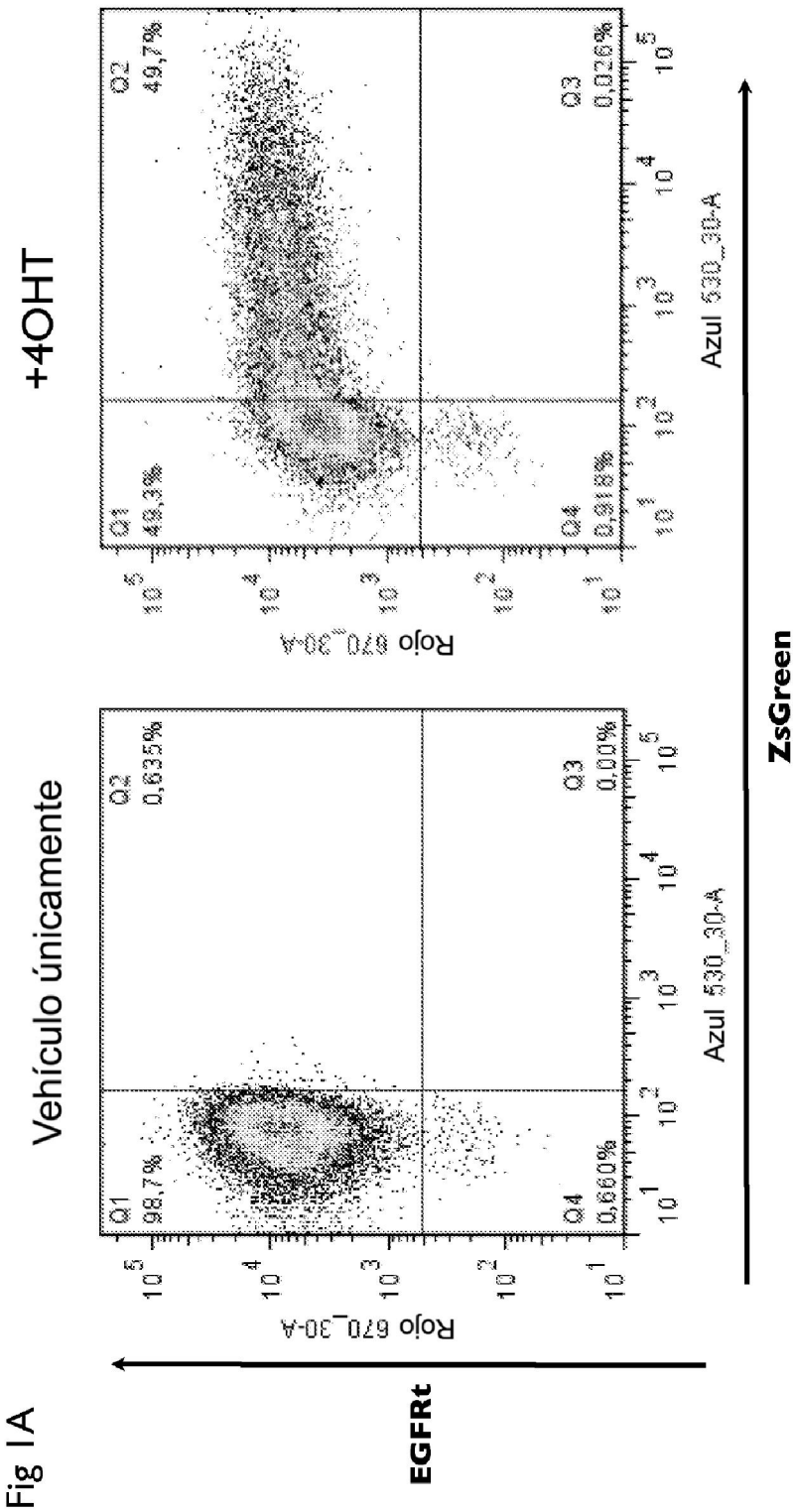


Fig 2

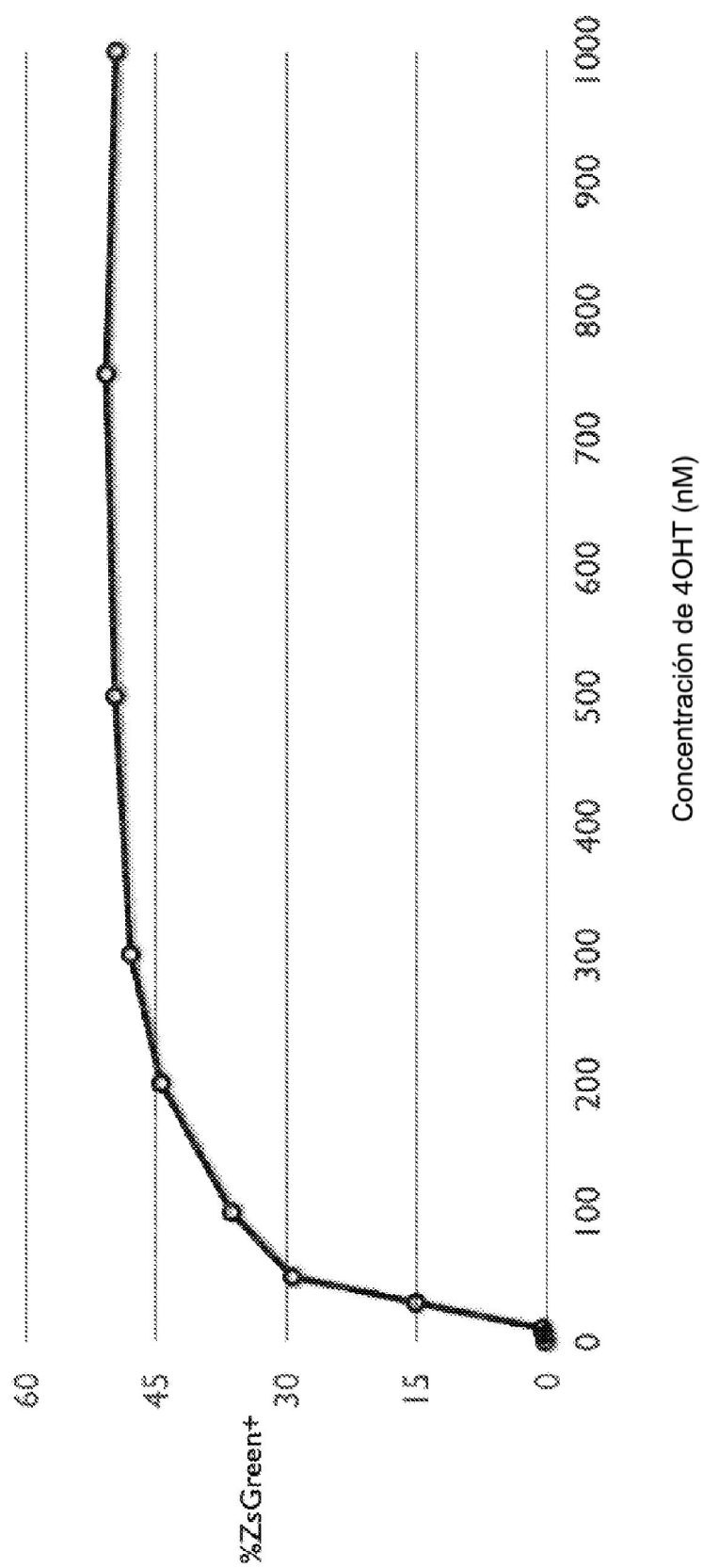
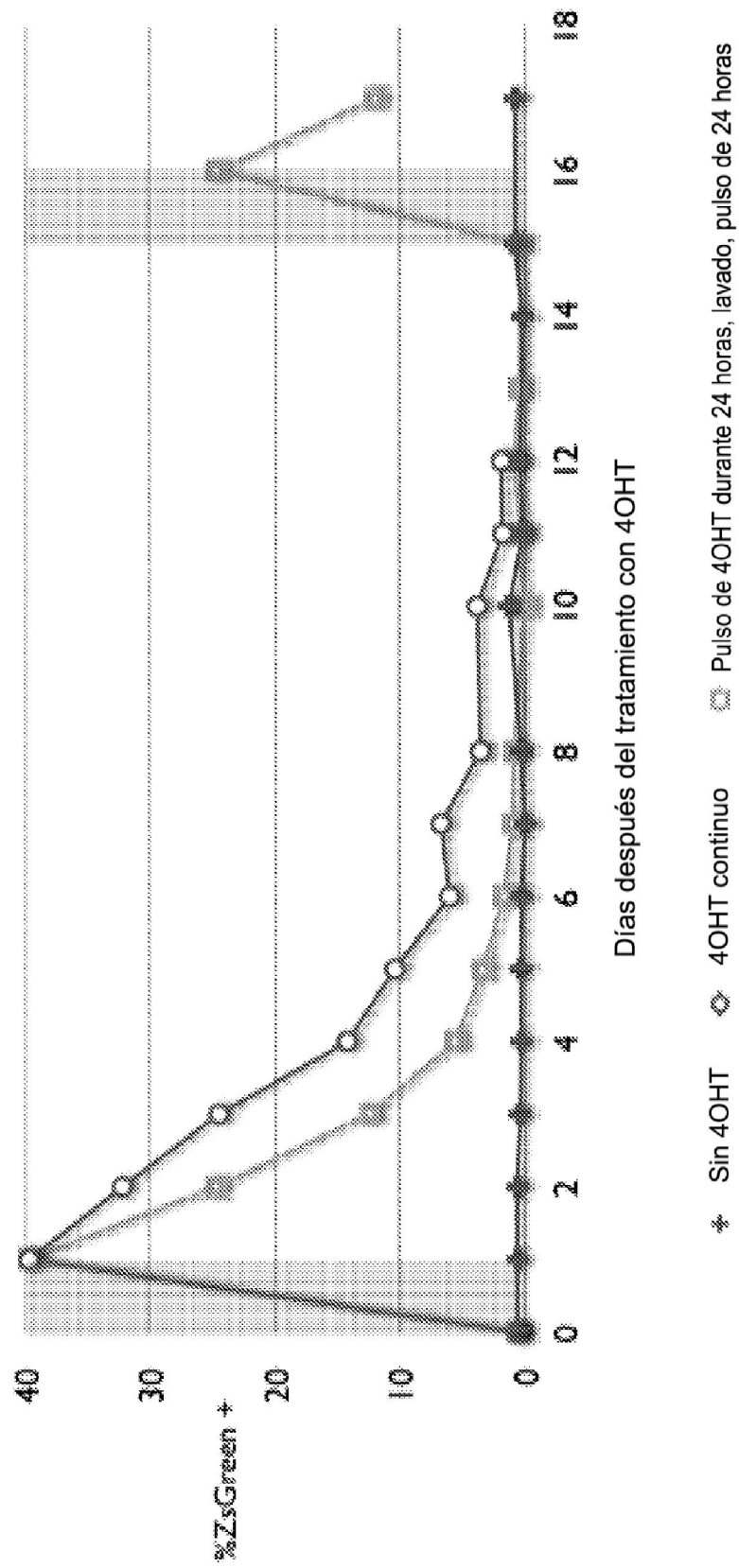
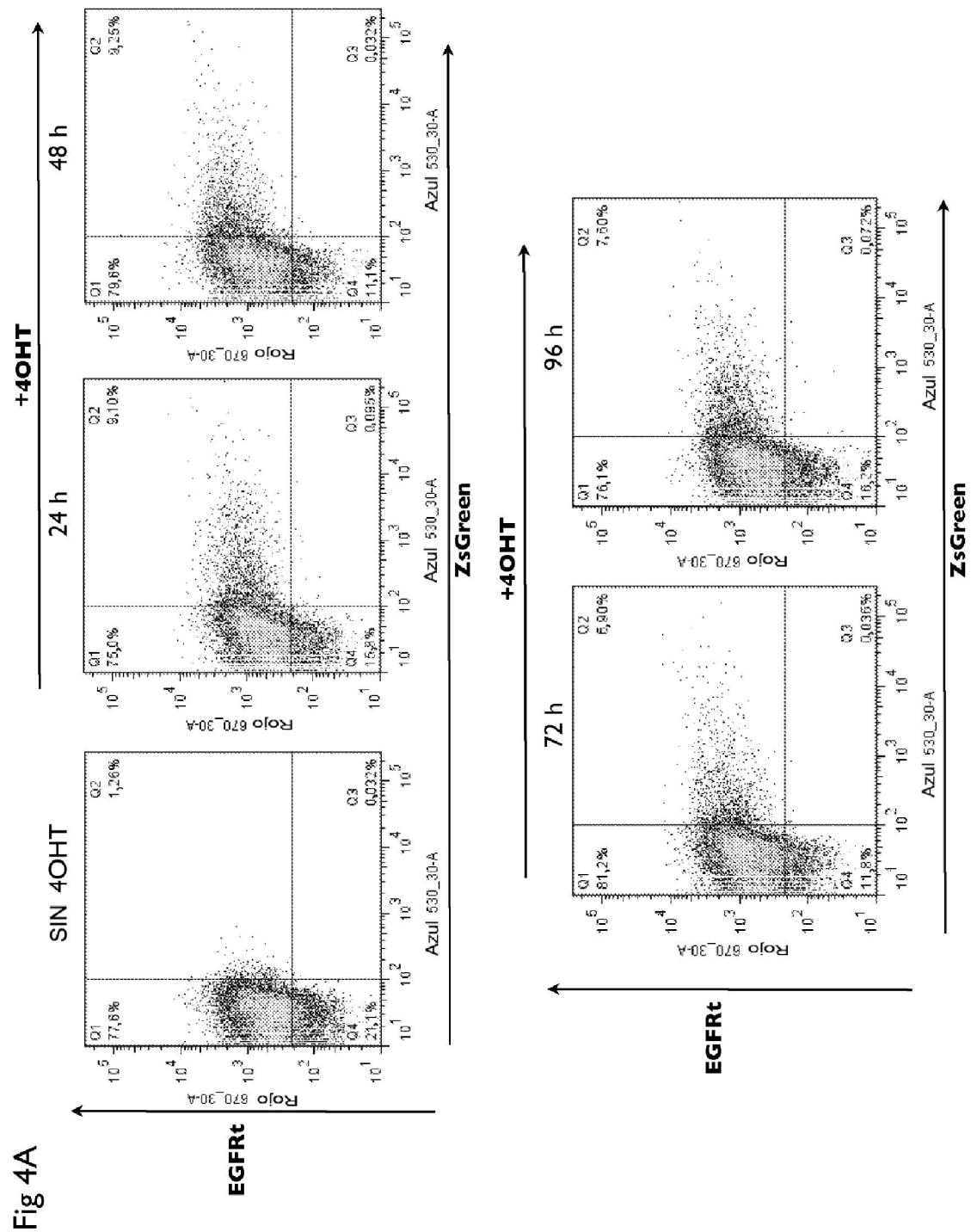
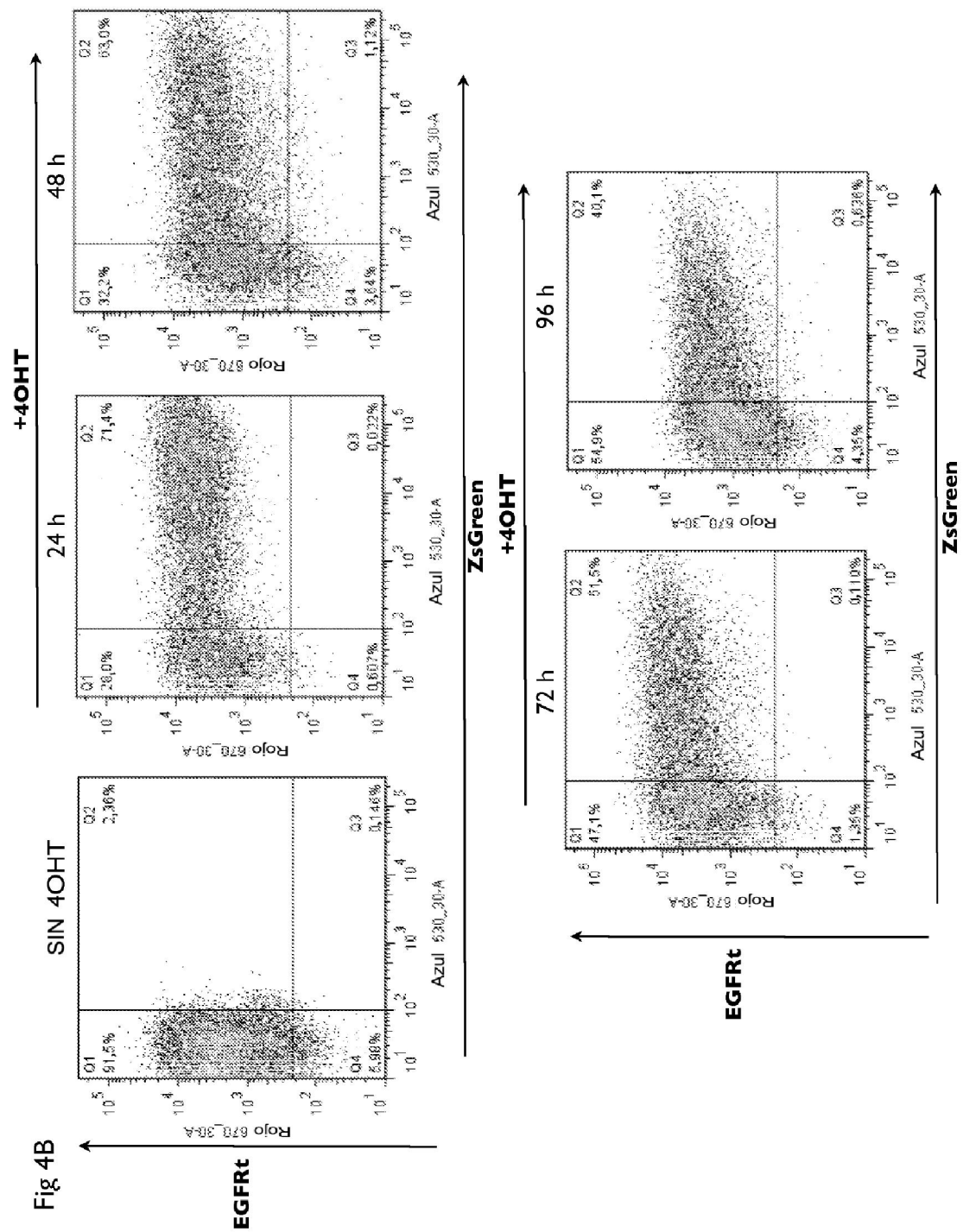


Fig 3







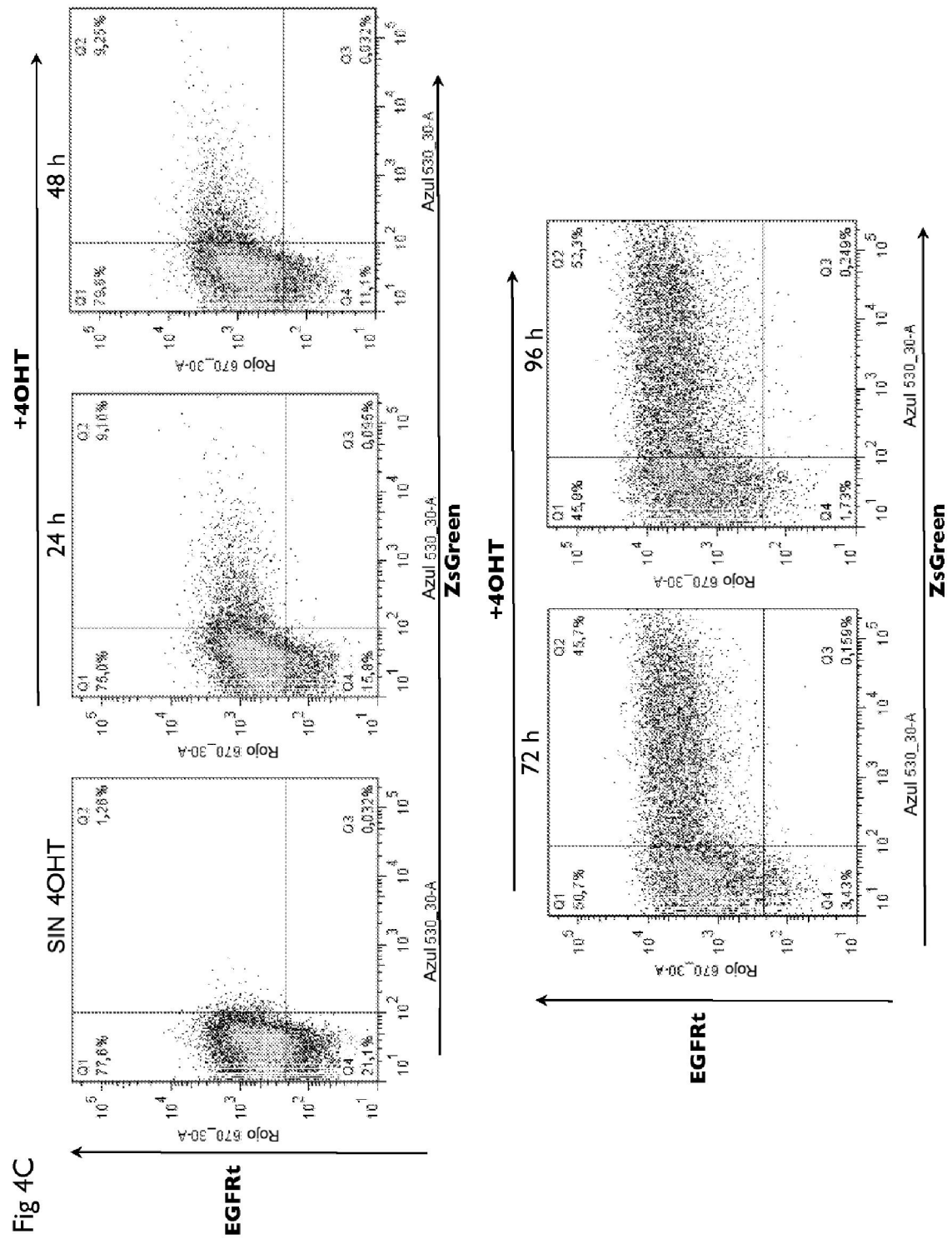


Fig 4D

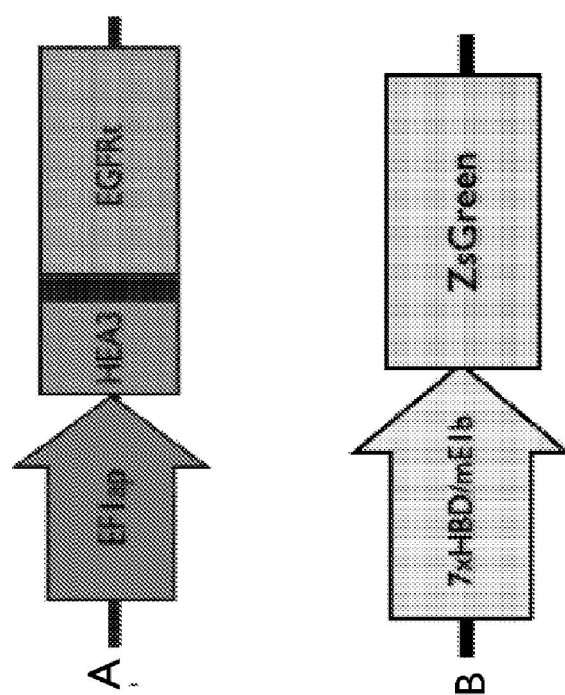


Fig 5A

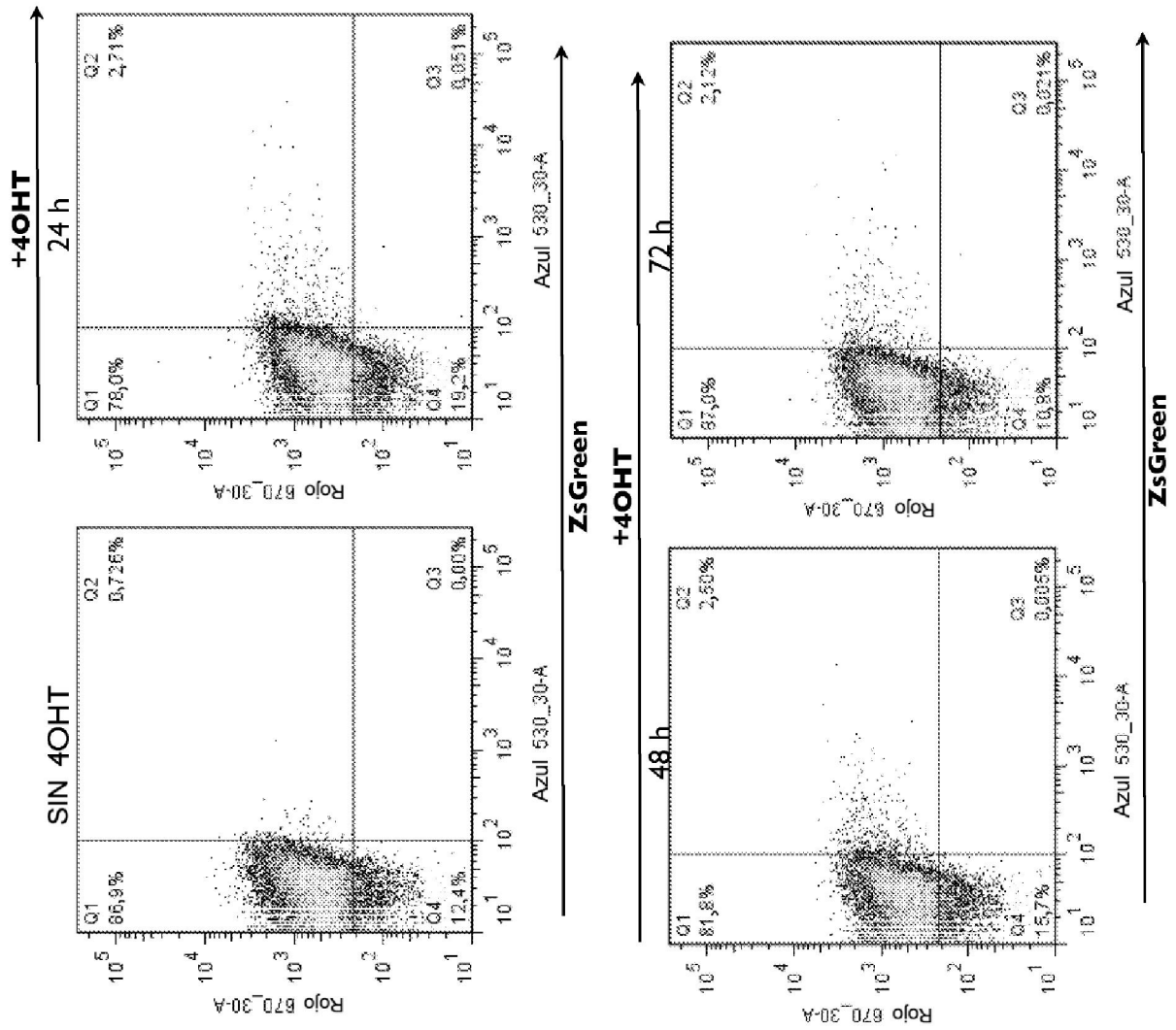
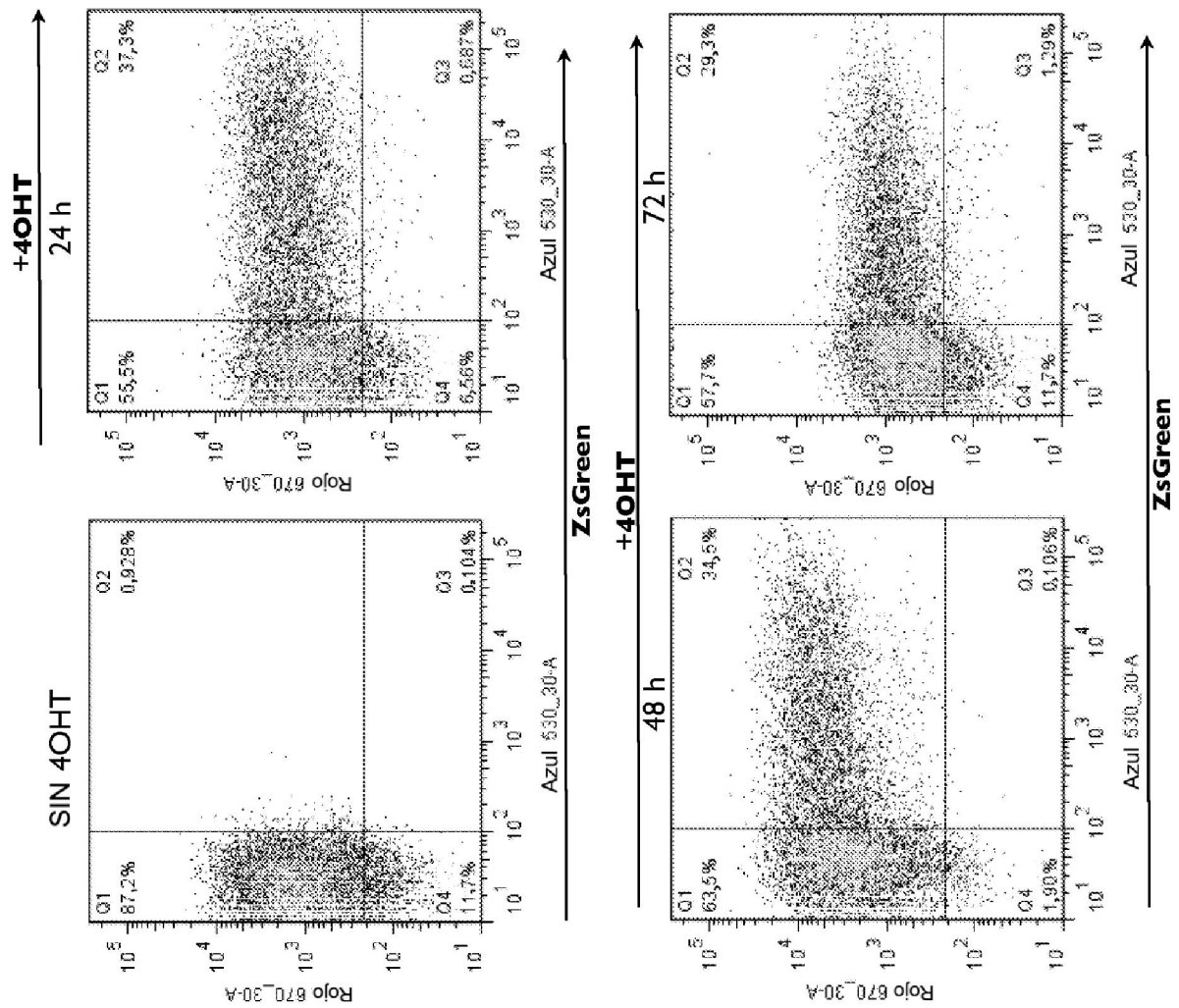


Fig 5B



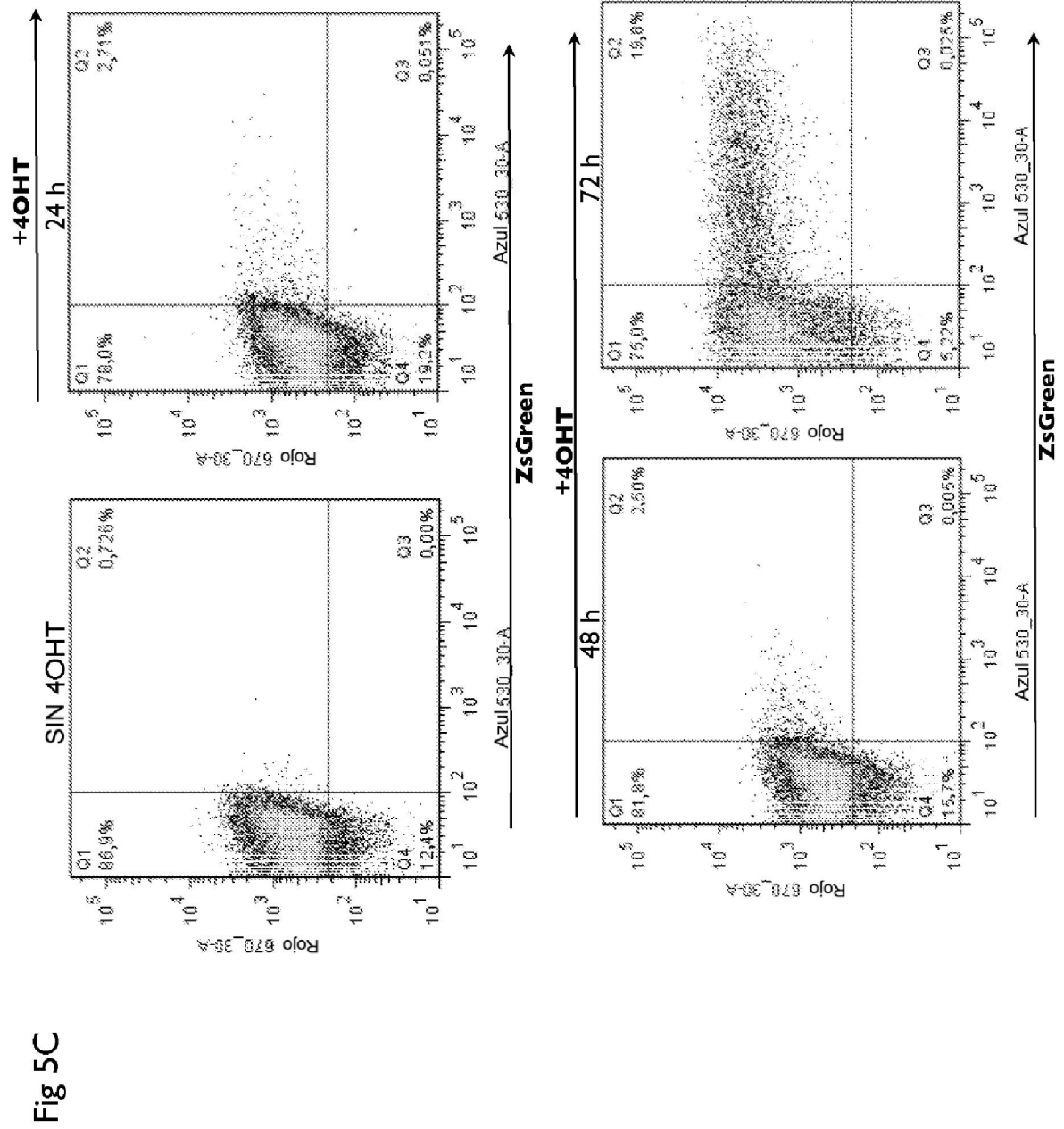
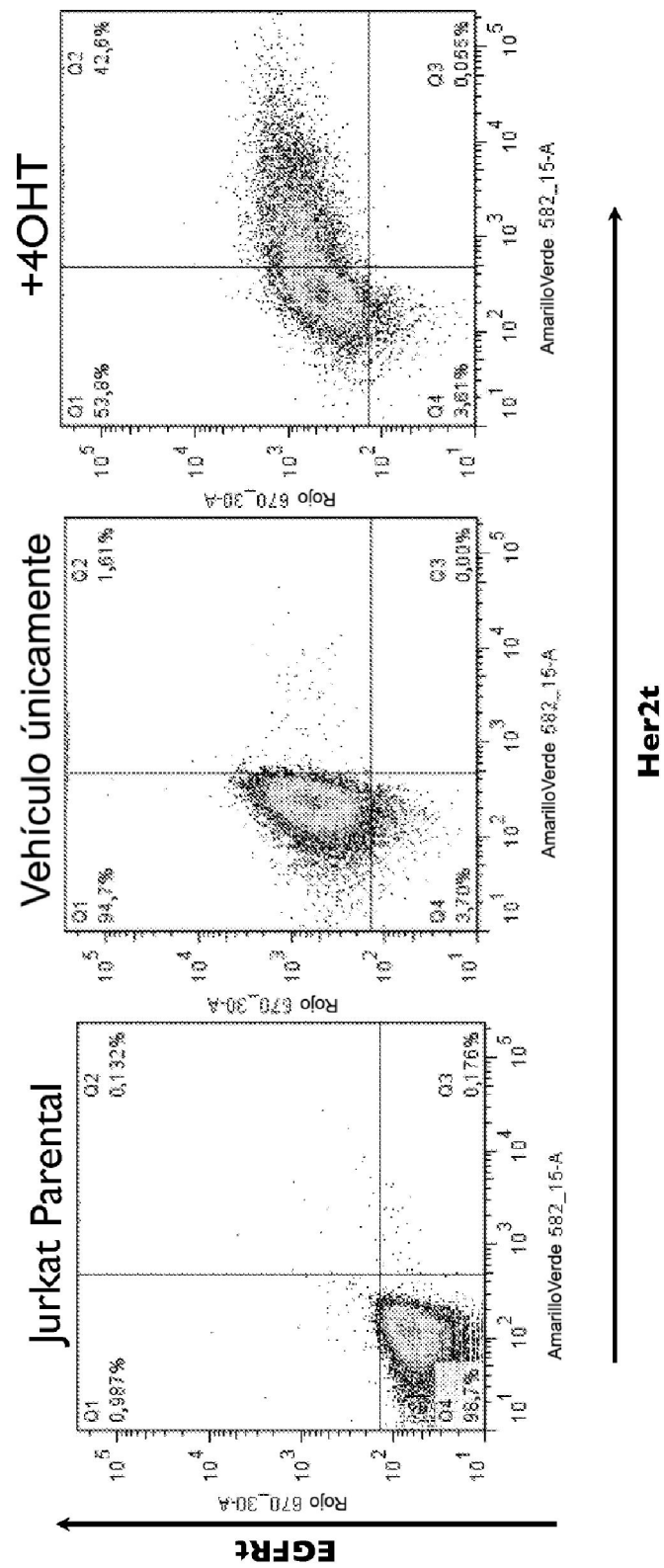


Fig 6A



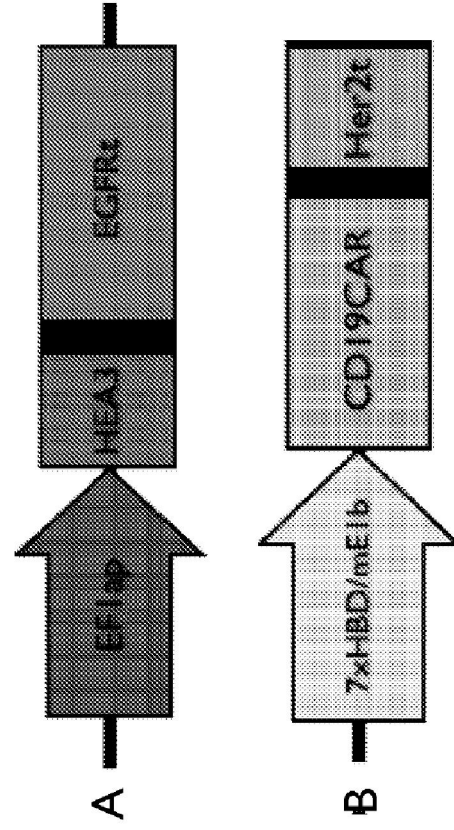
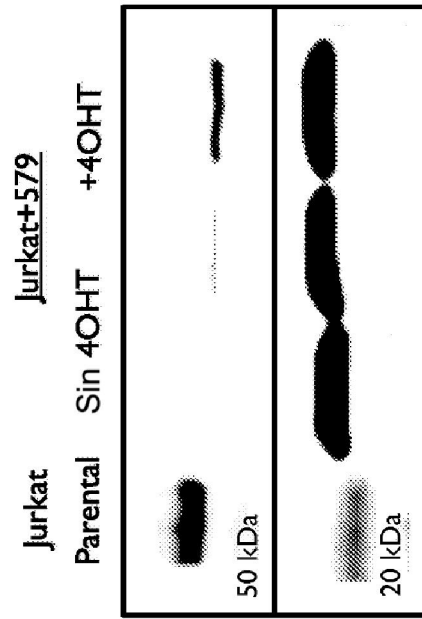
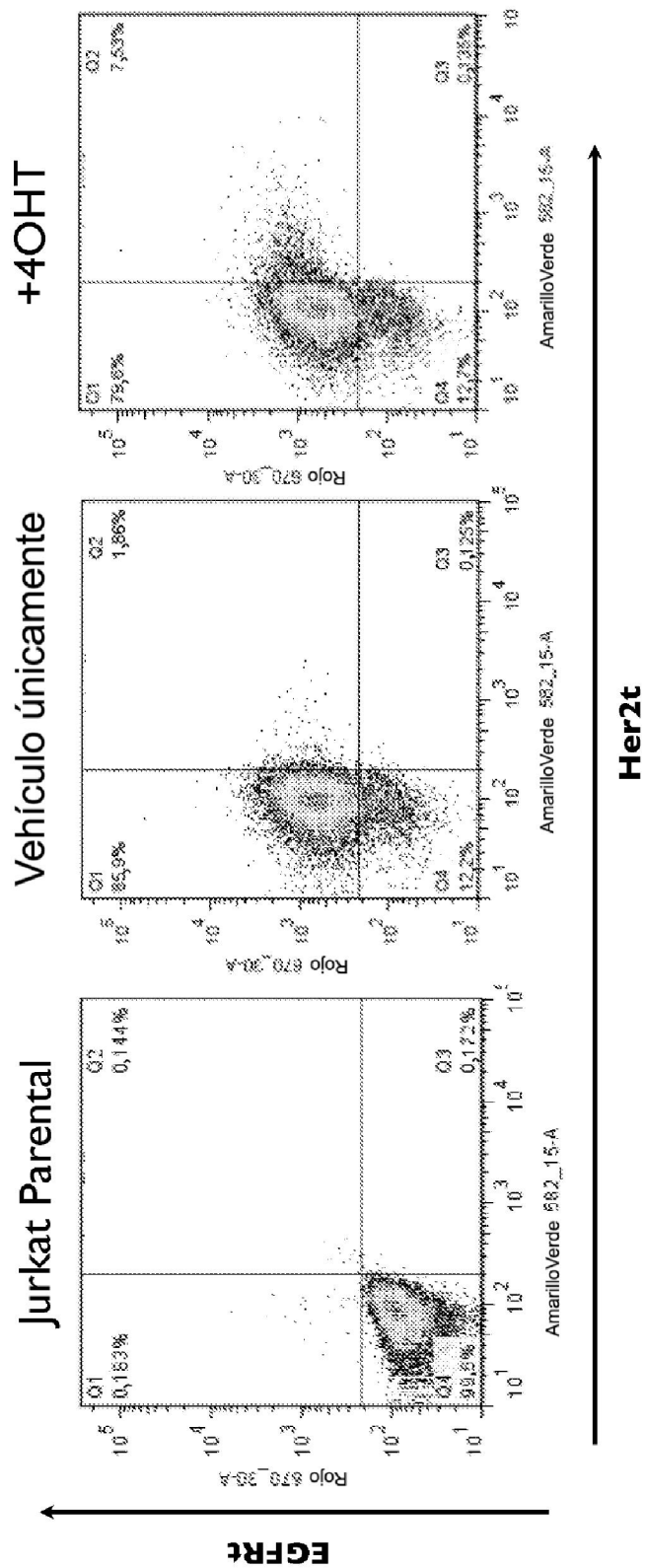


Fig 7A



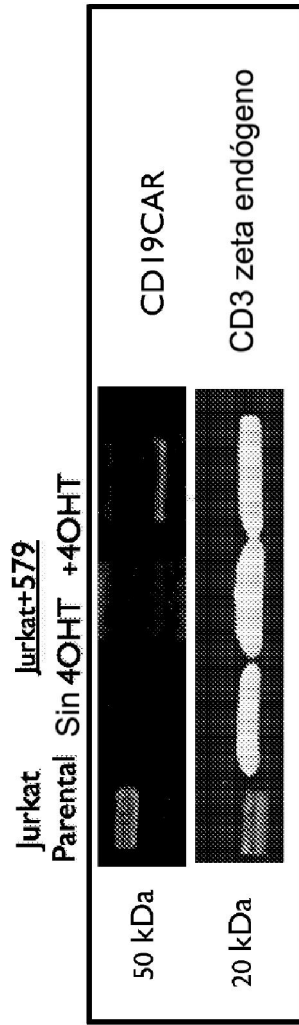


Fig 7B

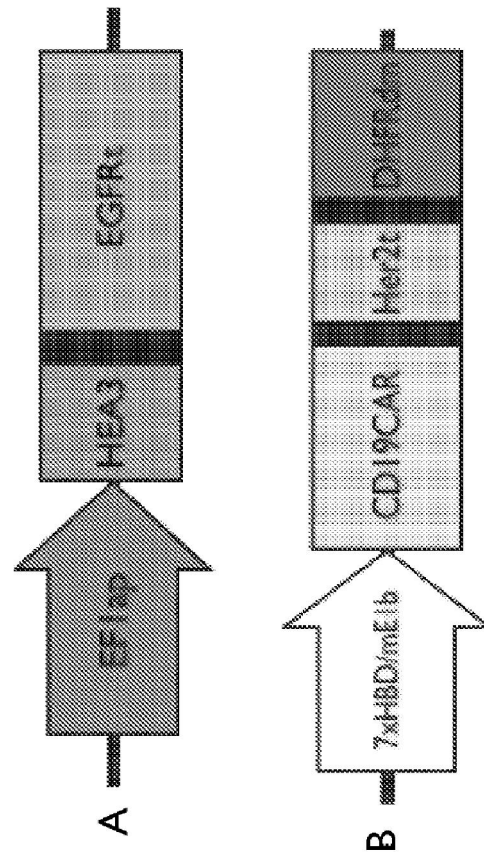


Fig 7C

Fig 8A

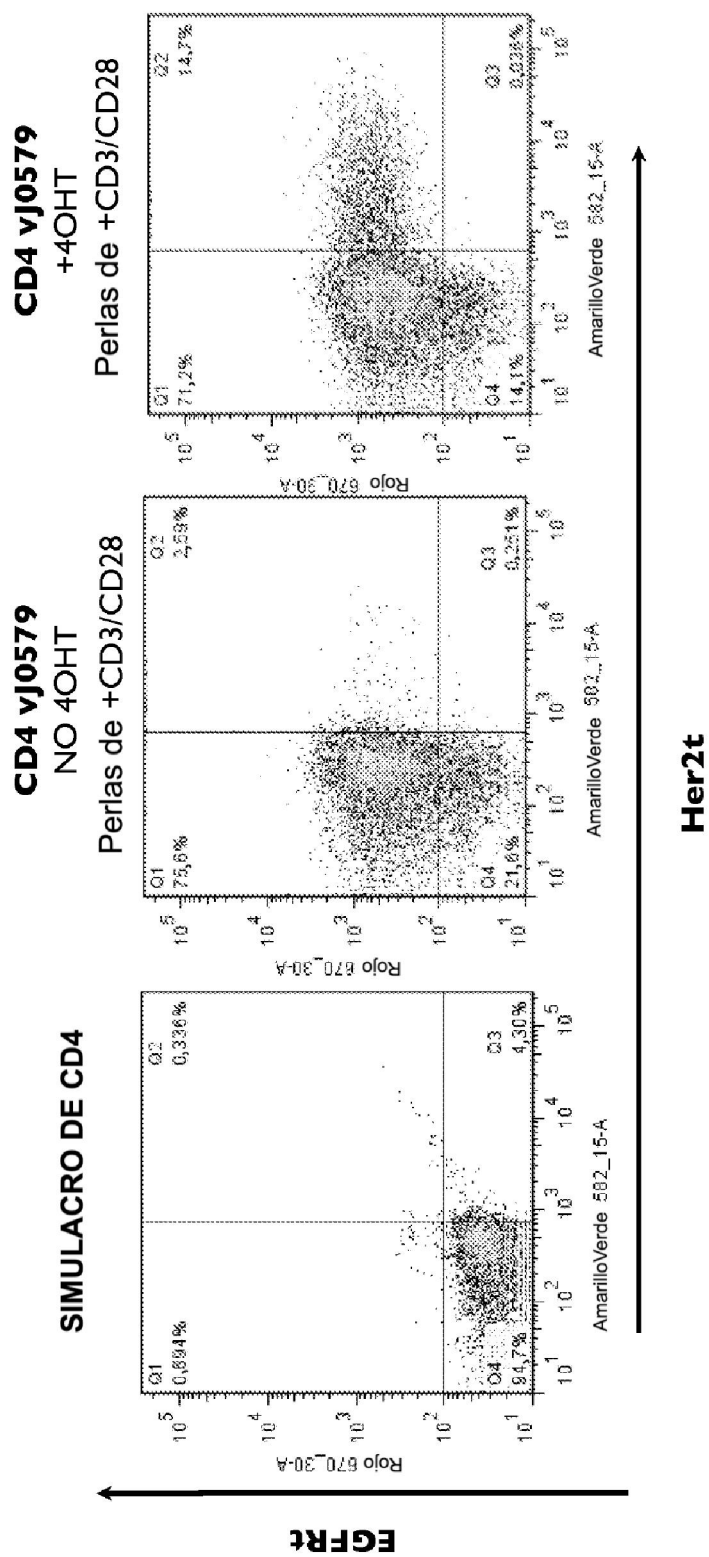


Fig 8B

