

INMUNOTERAPIA CON CÉLULAS CAR DE ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica la prioridad de acuerdo con 35 U.S.C § 119(d) de la Solicitud Provisional de los EE.UU. No. 62/644,343, presentada el 16 de marzo de 2018, cuyo contenido se incorpora en la presente descripción a modo de referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente descripción se refiere en general al campo de la inmunología humana, específicamente la inmunoterapia contra el cáncer.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La siguiente descripción de los antecedentes de la invención se proporciona simplemente para ayudar a la técnica para la presente invención.

Los regímenes actuales de tratamiento del cáncer incluyen quimioterapias, fármacos inmunomoduladores¹⁴, anticuerpos monoclonales¹⁵ y trasplantes autólogos o alogénicos. Estas terapias a menudo conducen a la remisión, pero casi todos los pacientes eventualmente recaen y sucumben a la muerte debido al regreso de la enfermedad. Por lo tanto, existe una necesidad insatisfecha de nuevas terapias, incluyendo nuevas inmunoterapias de combinación para la enfermedad en recidiva y/o refractaria. Esta descripción aborda estas limitaciones y también proporciona ventajas relacionadas.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

Las células T del receptor de antígeno quimérico ("CAR", por sus siglas en inglés) se han utilizado con éxito en la clínica para el tratamiento de neoplasias malignas hematológicas y tumores sólidos, y recientemente han sido aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos ("FDA", por sus siglas en inglés) de los EE.UU.¹⁻⁴. Los anticuerpos biespecíficos ("BsAb", por sus siglas en inglés) también han sido aprobados por la FDA para el tratamiento del cáncer y se están utilizando como un método inmunoterapéutico alternativo a la terapia con células T con CAR⁵. Sin embargo, las inmunoterapias contra el cáncer a base de CAR y BsAb todavía necesitan mejoras por cinco razones importantes. En primer lugar, en algunos casos, las células T con CAR no pueden expandirse *in vivo* y no pueden sobrevivir durante un período de tiempo suficiente para iniciar la lisis tumoral en los pacientes⁶. Se ha informado que la eficacia de las células T con CAR se correlaciona con la cantidad y duración de la presencia de células T con CAR *in vivo*⁶⁻⁸. En segundo lugar, las células tumorales pueden eliminar antígenos objetivo para evadir la terapia, especialmente cuando sólo se dirigen a un único antígeno. En tercer lugar, además de ser costoso y lento de fabricar, el BsAb tiene una vida media corta y hasta la fecha no se ha demostrado que sea curativo^{9,10}. En cuarto lugar, la terapia de combinación de células T con CAR con BsAb dirigidos a dos antígenos distintos asociados a tumores podría ser un buen método; sin embargo, producir cada uno *ex vivo* individualmente sería laborioso y

costoso; la modificación genética de células T para expresar tanto un CAR como un BsAb dentro de una única construcción, de la cual BsAB involucra a todas las células efectoras citolíticas aún no se ha informado o demostrado que sea aditiva o sinérgica, o que mejore la supervivencia de las células T *in vivo*. Finalmente, los métodos actuales de la inmunoterapia con CAR se centran principalmente en un tipo de célula inmune, es decir, las células T, excluyendo todas las demás células efectoras citolíticas en los grupos innato y adaptativo del sistema inmune. El receptor de células citolíticas grupo 2 miembro D ("NKG2D", por sus siglas en inglés) es un tipo de receptor de c-lectina que se expresa en prácticamente todas las células efectoras citolíticas en los grupos innato y adaptativo del sistema inmune^{11,12}.

Esta descripción proporciona una plataforma para resolver estos problemas, en parte o en su totalidad, modificando las células T infectadas con un solo vector que administra estos dos modos de terapia, es decir, produciendo una célula T cuyo CAR se dirige a un antígeno específico asociado al tumor.

Por lo tanto, en un aspecto, en la presente se proporcionan receptores de antígenos quiméricos (CARs) que comprenden, o alternatively consisten esencialmente en, o que además consisten en: (a) un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo dirigido contra un cáncer o un tumor; (b) un dominio de bisagra; (c) un dominio transmembrana; y (d) un dominio intracelular. Otros aspectos de la descripción se refieren a un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende, o alternatively que consiste esencialmente en, o que además consiste en: (a) un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo dirigido a un tumor; (b) un dominio de bisagra CD8 α ; (c) un dominio transmembrana de CD8 α ; (d) una región de señalización coestimuladora de CD28 y/o una región de señalización coestimuladora de 4-1BB; y (e) un dominio de señalización de CD3 zeta.

En determinadas modalidades, el dominio de unión al antígeno del anticuerpo dirigido al tumor comprende, o alternatively consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que están opcionalmente unidas por un péptido enlazador. En algunas modalidades, la región variable de cadena pesada y/o ligera comprende, o alternatively consiste esencialmente en las mismas, o además consiste en las regiones determinantes de complementariedad ("CDRs", por sus siglas en inglés) relevantes de un anticuerpo para cualquiera de los antígenos de maduración de células B (BCMA) y/o miembro 7 de la familia SLAM ("SLAMF7", por sus siglas en inglés; también conocido como CS1 o CD319), y/o un equivalente de cada uno de ellos. En un aspecto, el anticuerpo dirigido al tumor se dirige a BCMA. En algunas modalidades, la región variable de cadena pesada y/o cadena ligera comprende, o alternatively consiste esencialmente en las mismas, o además consiste en la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo contra cualquiera de los antígenos de maduración de células B ("BCMA", por sus

siglas en inglés) y/o SLAMF7 (también conocido como CS1 o CD319), y/o un equivalente de cada uno de ellos.

En ciertas modalidades, el CAR comprende además, o alternatively consiste además esencialmente en, o además consiste en, un polipéptido enlazador ubicado entre la
 5 región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera. En determinadas modalidades, el enlazador es un enlazador de glicina-serina. En modalidades adicionales, el polipéptido enlazador comprende, o alternatively consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en la secuencia (glicina-serina)_n en donde n es un número entero de 1 a 6.

En determinadas modalidades, el CAR comprende adicionalmente, o alternatively
 10 consiste además esencialmente en, o además consiste en, un marcador detectable y/o un marcador de purificación unido al CAR.

Los aspectos adicionales de la descripción se refieren a una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica un CAR, como se describió anteriormente, o su complemento, o un equivalente de cada uno de ellos.

En determinadas modalidades, la secuencia de ácido nucleico aislada comprende
 15 adicionalmente, o consiste además esencialmente en, o además consiste en, una secuencia consenso de Kozak ubicada aguas arriba del polinucleótido que codifica el dominio de unión al antígeno de un cáncer o anticuerpo dirigido a un tumor.

En ciertos aspectos, el ácido nucleico aislado comprende además, o alternatively
 20 consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en un polinucleótido que codifica un polipéptido de resistencia a antibióticos acoplado operativamente al ácido nucleico aislado, un promotor y/o un elemento potenciador.

También se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo
 25 biespecífico que reconoce y se une a NKG2D. En algunas modalidades, el ácido nucleico codifica un anticuerpo biespecífico que comprende, o alternatively consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en un ligando NKG2D y, opcionalmente, un ligando SLAMF7 (también conocido como CS1 o CD319) que están opcionalmente optimizados por codones. En ciertas modalidades, el ácido nucleico aislado codifica un anticuerpo biespecífico que comprende, o alternatively consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en las
 30 regiones CDR relevantes de un anticuerpo para NKG2D y, opcionalmente, SLAMF7 (también conocido como CS1 o CD319), que están opcionalmente optimizados por codones, o un equivalente de cada uno de ellos. En algunas modalidades, el ácido nucleico codifica un anticuerpo biespecífico que comprende, o alternatively consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en la región variable de cadena pesada y/o cadena ligera de un anticuerpo contra NKG2D y, opcionalmente, SLAMF7 (también conocido como CS1 o CD319),
 35 que están opcionalmente optimizados por codones, y/o un equivalente de cada uno de ellos. En algunas modalidades, el ácido nucleico codifica un anticuerpo biespecífico que comprende un

fragmento variable monocatenario ("scFV", por sus siglas en inglés) derivado de un anticuerpo contra NKG2D y, opcionalmente, un fragmento variable monocatenario (scFV) derivado de SLAMF7 (también conocido como CS1 de CD319), que están opcionalmente optimizados por codones, y/o un equivalente de cada uno de ellos. En determinadas modalidades, el ácido nucleico aislado comprende adicionalmente, o alternativamente consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en un polinucleótido que codifica un gen de resistencia a antibióticos.

En otro aspecto, se proporcionan en la presente ácidos nucleicos aislados que codifican, en una construcción, el CAR y el anticuerpo biespecífico como se describió anteriormente ("construcción de BsAb-CAR"). En un aspecto, el ácido nucleico aislado codifica un fragmento de unión a antígeno que se dirige a BCMA y un anticuerpo biespecífico, por ejemplo, un scFv de un anticuerpo anti-CS1 y un scFv de un anticuerpo anti-NKG2D, unidos por un ácido nucleico que codifica un enlazador proteico no inmunogénico, tal como de la aldosa de músculo humano. En la Figura 3A se muestra un vector BsAb-CAR ejemplar. Los vectores comprenden opcionalmente secuencias reguladoras, tales como promotores, potenciadores y repeticiones terminales largas ("LTRs", por sus siglas en inglés) virales.

Los aspectos de la descripción se refieren a un vector que comprende uno o más de los ácidos nucleicos aislados descritos anteriormente. En determinadas modalidades, el vector es un plásmido o un vector viral seleccionado del grupo de un vector retroviral, un vector lentiviral, un vector adenoviral y un vector viral adenoasociado. Los ácidos nucleicos aislados y los vectores que los contienen son útiles para preparar los CARs como se describe en la presente.

Otros aspectos de la descripción se refieren a una célula aislada que comprende, o alternativamente consiste esencialmente en la misma, o que además consiste en una o más de las composiciones descritas anteriormente: un CAR, un ácido nucleico aislado que codifica un CAR o su complemento, un ácido nucleico aislado que codifica la construcción CAR/BsA, o un vector que contiene los ácidos nucleicos aislados. En algunas modalidades, el CAR se expresa en la superficie de la célula aislada.

En ciertas modalidades, la célula aislada comprende además, o alternativamente consiste esencialmente en, o además consiste en, un ácido nucleico aislado que comprende, o alternativamente consiste esencialmente en, o además consiste en un polinucleótido que codifica un anticuerpo biespecífico, que opcionalmente reconoce y se une a NKG2D. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende, o alternativamente consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en un ligando NKG2D o un fragmento de unión al antígeno anti-NKG2 de un anticuerpo anti-NKG2 y, opcionalmente, un ligando SLAMF7 (también conocido como CS1 de CD319). En ciertas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende, o alternativamente consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en las regiones de cadena ligera y cadena pesada relevantes o las regiones CDR de un anticuerpo contra NKG2D y, opcionalmente, SLAMF7 (también conocido como CS1 o CD319), que están opcionalmente

optimizados por codones, o un equivalente de cada uno de ellos. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende, o alternatively consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en la región variable de cadena pesada y/o cadena ligera de un anticuerpo contra NKG2D y, opcionalmente, SLAMF7 (también conocido como CS1 o CD319), que están

5 opcionalmente optimizados por codones, y/o un equivalente de cada uno de ellos. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un fragmento variable monocatenario (scFV) derivado de un anticuerpo contra NKG2D y, opcionalmente, un fragmento variable monocatenario (scFV) derivado de SLAMF7 (también conocido como CS1 de CD319), que están opcionalmente optimizados por codones, y/o un equivalente de cada uno de ellos. En

10 determinadas modalidades, el ácido nucleico aislado comprende adicionalmente, o alternatively consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en un polinucleótido que codifica un gen de resistencia a antibióticos.

Los ejemplos no limitativos de una célula aislada son una célula procariota, tal como una célula bacteriana, por ejemplo, una *E. coli*, o una célula eucariota. En algunas modalidades, la

15 célula eucariota se selecciona de una célula animal, una célula de mamífero, una célula bovina, una célula felina, una célula canina, una célula murina, una célula equina o una célula humana. En modalidades adicionales, la célula aislada es la célula que es una célula T, una célula B, una célula citolítica natural ("NK", por sus siglas en inglés), una célula dendrítica, una célula mieloide, un monocito, un macrófago, cualquier subconjunto de los mismos o cualquier otra célula inmune

20 de cualquiera de las especies según lo descrito en la presente.

Los aspectos de la descripción se refieren a una composición que comprende, o alternatively consiste esencialmente en, o además consiste en una o más de las composiciones descritas anteriormente, por ejemplo, un CAR, un ácido nucleico aislado, una célula, o un vector y un portador.

25 En determinadas modalidades, la composición además comprende, o alternatively consiste esencialmente en, o además consiste en, un anticuerpo biespecífico, que opcionalmente reconoce y se une a NKG2D, y/o un ácido nucleico aislado que comprende un polinucleótido que codifica un anticuerpo biespecífico, que opcionalmente reconoce y se une a NKG2D. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende, o alternatively

30 consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en un ligando NKG2D y, opcionalmente, un ligando SALMF7 (también conocido como CS1 o CD319). En ciertas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende, o alternatively consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en las regiones CDR relevantes de un anticuerpo contra NKG2D y, opcionalmente, SLAMF7 (también conocido como CS1 o CD319), o un equivalente

35 de cada uno de ellos. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende, o alternatively consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en la región variable de cadena pesada y/o cadena ligera de un anticuerpo contra NKG2D y, opcionalmente, SLAMF7

(también conocido como CS1 o CD319), y/o un equivalente de cada uno de ellos. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un fragmento variable monocatenario (scFv) derivado de un anticuerpo contra NKG2D y, opcionalmente, un fragmento variable monocatenario (scFv) derivado de SLAMF7 (también conocido como CS1 o CD319), y/o un equivalente a cada uno de ellos.

Los aspectos de la descripción se refieren a un complejo aislado que comprende un CAR o una célula que comprende el CAR unido a un antígeno canceroso o tumoral o un fragmento del mismo, y/o una célula que expresa el antígeno canceroso o tumoral. En un aspecto, el dominio de unión a antígeno se expresa en la superficie de la célula. En otro aspecto, el antígeno canceroso o tumoral es el antígeno de maduración de células B (BCMA), SLAMF7 (también conocido como CS1 o CD319) y/o un equivalente de cada uno de ellos. En un aspecto, la célula que contiene o expresa el CAR es una célula T, una célula B, una célula NK, una célula dendrítica, una célula mieloide, un monocito, un macrófago, cualquier subconjunto de los mismos o cualquier otra célula inmune. Los tumores o las células pueden ser de cualquier animal, por ejemplo, de un mamífero, tal como una célula humana.

Algunos aspectos de la descripción se relacionan con un método para producir una célula que expresa CAR o una célula que expresa CAR que secreta BsA, en donde el método comprende, o alternatively consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en transducir una célula aislada con la secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR y BsA, o el ácido nucleico aislado que codifica BsAb-CAR, como se describe en la presente.

En un aspecto adicional, el método comprende además seleccionar y aislar la célula que expresa CAR o BsAb-CAR. En un aspecto adicional, la célula es una célula eucariota, tal como una célula de mamífero, por ejemplo, una célula humana, tal como una célula T, una célula B, una célula NK, una célula dendrítica, una célula mieloide, un monocito, un macrófago, cualquier subconjunto de los mismos, o cualquier otra célula inmune. Las células se pueden transducir usando los vectores virales como se describe en la presente o alternatively usando la tecnología descrita en Riet et al. (2013) Meth. Mol. Biol. 969:187-201 con el título "Nonviral RNA transfection to transiently modify T cell with chimeric antigen receptors for adoptive therapy."

En ciertas modalidades, el método comprende además, o alternatively consiste esencialmente en, o además consiste en transducir la célula con un ácido nucleico aislado que comprende, o alternatively consiste esencialmente en, o además consiste en un polinucleótido que codifica un anticuerpo biespecífico, que opcionalmente reconoce y se une a NKG2D. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende, o alternatively consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en un ligando NKG2D y, opcionalmente, un ligando SLAMF7 (también conocido como CS1 o CD319), cada uno opcionalmente optimizado por codones. En ciertas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende, o alternatively consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en las

regiones CDR relevantes de un anticuerpo contra NKG2D y, opcionalmente, SLAMF7 (también conocido como CS1 o CD319), opcionalmente optimizados por codones, o un equivalente de cada uno de ellos. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende, o alternativamente consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en la región variable de cadena pesada y/o cadena ligera de un anticuerpo contra NKG2D y, opcionalmente, SLAMF7 (también conocido como CS1 o CD319), que están opcionalmente optimizados por codones, y/o un equivalente de cada uno de ellos. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un fragmento variable monocatenario (scFV) derivado de un anticuerpo contra NKG2D y, opcionalmente, un fragmento variable monocatenario (scFV) derivado de SLAMF7 (también conocido como CS1 o CD319), que están opcionalmente optimizados por codones, y/o un equivalente de cada uno de ellos. Las células se pueden transducir usando los vectores virales, por ejemplo, vectores lentivirales, como se describe en la presente o alternativamente usando la tecnología descrita en Riet et al. (2013) Meth. Mol. Biol. 969:187-201 con el título “Nonviral RNA transfection to transiently modify T cell with chimeric antigen receptors for adoptive therapy.”

En determinadas modalidades, el método de producción de una célula que expresa CAR o BsAb-CAR comprende además, o alternativamente consiste esencialmente en, o además consiste en activar y expandir la población de células que expresan CAR. Ciertos aspectos de la presente descripción se refieren a una población activada aislada de células que comprenden, o alternativamente consisten esencialmente en, o que además consisten en un CAR o BsAb-CAR. En determinadas modalidades, las células son una o más células T, células B, células NK, células dendríticas, células mieloides, monocitos, macrófagos, cualquier subconjunto de los mismos o cualquier otra célula inmune.

Los aspectos de la descripción se refieren a un método para inhibir el crecimiento de un tumor que expresa un antígeno canceroso o tumoral, poniendo en contacto el tumor con una cantidad efectiva de las células o composiciones aisladas descritas anteriormente. El contacto puede ser *in vitro* o *in vivo*. Cuando el contacto es *in vitro*, el método puede usarse para probar la terapia personalizada contra el tumor de un paciente o para ensayar terapias de combinación. Cuando el contacto es *in vivo*, el método es útil para inhibir el crecimiento de la célula tumoral o cancerosa en un sujeto que lo necesita, tal como un paciente humano que padece cáncer y el paciente recibe una cantidad efectiva de las células. En determinadas modalidades, el tumor es un tumor sólido. Se administra una cantidad efectiva sola o en combinación con otras terapias según se describe en la presente. En determinadas modalidades, el cáncer/tumor objetivo es un tumor sólido o un cáncer que afecta a la sangre y/o la médula ósea, por ejemplo, mieloma múltiple (MM). En determinadas modalidades, las células aisladas son autólogas del sujeto que se está tratando. En otro aspecto, las células son alogénicas para el sujeto que está siendo tratado. En otro aspecto, el método comprende además, o consiste esencialmente en, o además

consiste en, administrar al sujeto una cantidad efectiva de una terapia citorreductora. En un aspecto adicional, el método comprende además los pasos de aislar las células que se van a administrar al sujeto, transducir las células con una cantidad efectiva de un ácido nucleico aislado que codifica un CAR o BsAb-CAR según se describe en la presente, cultivar las células para obtener una población de células que codifican CAR o BsAb-CAR, que opcionalmente se expanden y activan, y posteriormente administrar las células al paciente.

También se describen en la presente kits que comprenden una o más de las composiciones indicadas anteriormente e instrucciones para su uso en los métodos descritos en la presente.

- 10 Las composiciones y métodos anteriores son únicos y superan la limitación del estado de la técnica en el sentido de que proporcionan una célula CAR que secreta simultáneamente un BsAb a base de NKG2D dirigido a un segundo antígeno asociado al tumor. El BsAb a base de CAR NKG2D descrito es sólo a modo de ejemplo. Este método puede modificarse para cualquier número de antígenos tumorales, como se conoce en la técnica, por ejemplo, variante
- 15 III del receptor del factor de crecimiento epidérmico ("EGFRVIII", por sus siglas en inglés); CD70, mesotelina, CD123, CD19, antígeno carcinoembrionario ("CEA", por sus siglas en inglés), CD133, gen receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano ("Her2", por sus siglas en inglés), ver Townsend et al. (2018) J. Exp. & Clinical Cancer Res. 37:163.

- Las construcciones ejemplares se probaron en un modelo de mieloma múltiple (MM). El
- 20 MM es una neoplasia maligna caracterizada por la acumulación de células plasmáticas clonales¹³. Como se señaló anteriormente, los regímenes de tratamiento actuales que incluyen quimioterapias¹⁴, fármacos inmunomoduladores, anticuerpos monoclonales¹⁵ y trasplantes autólogos o alogénicos a menudo conducen a la remisión, pero casi todos los pacientes finalmente recaen y mueren debido al regreso de la enfermedad. Por lo tanto, existe una
- 25 necesidad insatisfecha de nuevas terapias, incluyendo nuevas inmunoterapias de combinación para el MM en recidiva y/o refractario.

- Como componente del sistema inmune innato, las células citolíticas naturales (NK) desempeñan un papel importante en la prevención del crecimiento tumoral¹⁶, pero se ha descubierto que la actividad antitumoral de las células NK está disminuida en muchos pacientes
- 30 con MM¹⁷. La transferencia adoptiva de células NK activadas o alogénicas produce respuestas antitumorales efectivas en el tratamiento de varias neoplasias malignas hematológicas, incluyendo MM^{18,19} y tumores sólidos. Sin embargo, en muchos casos, las respuestas antitumorales mediadas por células NK son débiles, lo que puede deberse a la expresión de receptores inhibidores por células NK, una capacidad deficiente de supervivencia o una
- 35 migración limitada de las células efectoras a los sitios del tumor²⁰⁻²². Mientras tanto, como parte de la inmunidad adaptativa, las células T pueden migrar eficientemente a varios tejidos y tienden a proliferar bien en respuesta a la estimulación antigénica. Sin embargo, las células T tienen

especificidades estrictas dictadas por los receptores de células T ("TCR", por sus siglas en inglés) específicos de antígeno. Por lo tanto, un método para involucrar tanto a las células T como a las células NK, y así superar sus propias limitaciones, sería de gran beneficio para la inmunoterapia contra el cáncer. Esta descripción proporciona este beneficio.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **FIGURA 1A, FIGURA 1B, FIGURA 1C y FIGURA 1D** muestran los resultados de manipular células T para expresar BCMA CAR y proteína de fusión biespecífica anti-NKG2D-anti-CS1 individualmente o en combinación. (FIGURA 1A) Representación esquemática de las construcciones lentivirales de BCMA CAR que contienen un scFv contra BCMA ligado a endodominios CD28 y CD3zeta(ζ). La expresión del transgén se trazó mediante la expresión de proteína verde fluorescente ("GFP", por sus siglas en inglés) impulsada por un promotor de factor de elongación 1 alfa ("EF1 α ", por sus siglas en inglés). LTR, repeticiones terminales largas; SP, péptido señal, por sus siglas en inglés; VH, cadena pesada variable, por sus siglas en inglés; L, enlazador, por sus siglas en inglés; VL, cadena ligera variable, por sus siglas en inglés. MyC, etiqueta MyC; Bisagra, cadena de bisagra; CD28, una molécula coestimuladora de células T; CD3 ζ , cadena de CD3 zeta. (FIGURA 1B) Diagrama esquemático de la construcción lentiviral para la expresión en mamíferos del anticuerpo biespecífico (BsAb) anti-NKG2D-anti-CS1. El BsAb anti-NKG2D-anti-CS1 consistió en un scFv anti-NKG2D, que se compone de VH y VL unidas por un enlazador (L), y un scFv anti-CS1. La expresión del BsAb está dirigida por un promotor de CMV flanqueado por LTR lentiviral. (FIGURA 1C) Células mononucleares de sangre periférica ("PBMC", por sus siglas en inglés) de donantes sanos se activaron con perlas CD3 y CD28 y se transdujeron con el vector vacío ("EV", por sus siglas en inglés) Pcdh, BCMA CAR, BsAb anti-NKG2D-anti-CS1. Las células T activadas también se transdujeron secuencialmente con BsAb y BCMA-CAR, y estas células transducidas se denominaron "células T trans. sec. BsAb-BCMA". Se clasificaron las células positivas para GFP y se tiñeron las células con anticuerpo específico de Fab de cabra anti-ratón marcado con biotina o anticuerpo de control emparejado con isotipo, seguido de tinción con estreptavidina y anticuerpo CD3. (FIGURA 1D) Se recolectó sobrenadante de células T sin modificar, células T BsAb o células T trans. sec. BsAb-BCMA, y los lisados de células individuales se sometieron a análisis de inmunotransferencia con anticuerpo anti-etiqueta 6x His.

La **FIGURA 2A, FIGURA 2B, FIGURA 2C, FIGURA 2D, FIGURA 2E** muestran que las células T trans. sec. BsAb-BCMA poseen una mayor capacidad de citotoxicidad y producción de IFN-gamma (γ) que las células T BCMA-CAR o las células T BsAb en respuesta. (FIGURA 2A) Análisis de citometría de flujo de la expresión de BCMA y CS1 en la superficie de líneas celulares de MM. Se tiñeron tres líneas celulares de MM (MM1.S, H929 y RPMI-8226) y una línea celular de leucemia mielógena crónica (K562) con anticuerpo monoclonal ("mAb", por sus

35

siglas en inglés) anti-CS1 (panel superior) o mAb anti-BCMA (panel inferior), se utilizaron diferentes colores para distinguir las tres líneas celulares MM, MM.1S (verde), H929 (rojo) y RPMI-8226 (gris), así como la línea celular K562 (azul) o el anticuerpo de control emparejado con isotipo (línea sólida negra y área abierta). (FIGURA 2B) Las líneas celulares MM1.S, H929, RPMI-8226 MM etiquetadas con ^{51}Cr y la línea celular K562 (5×10^3 para cada línea celular) se cocultivaron con células T no modificadas (T, línea continua negra), células T trasducidas con vector vacío (T EV, línea punteada negra), las células T que expresan BsAb anti-NKG2D-anti-CS1 (T BsAb, línea sólida roja), BCMA CAR (T BCMA CAR, línea sólida verde), y células T trans. sec. BsAb-BCMA (línea continua azul) en las proporciones E:T indicadas durante 4 horas, y se midió la lisis objetivo (liberación de ^{51}Cr). T trans. sec. BsAb-BCMA frente a T con BCMA CAR, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; T trans. sec. frente a T BsAb, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$. Células K562 como control negativo de BCMA⁺CS1⁻. (FIGURA 2C) Se cultivaron células T no modificadas (cuadrado blanco), células T de EV (cuadrado de sombra gris), células T BsAb (cuadrado rojo), células T BCMA CAR (cuadrado verde) o células T trans. sec. BsAb-BCMA (cuadrado azul) 2×10^5 solas (sin objetivo) o estimuladas con un número igual de células MM.1S, H929 o RPMI-8226 MM que expresan diferentes niveles de células CS1 y BCMA o K562 BCMA⁺CS1⁻ durante 24 horas, y los sobrenadantes se recolectaron para medir la secreción de IFN- γ mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas ("ELISA", por sus siglas en inglés). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, n.s. ninguna diferencia significativa. (FIGURA 2D y FIGURA 2E) Las células se trataron como se describe en la (FIGURA 2C), y la secreción de IL-2 o factor de necrosis tumoral alfa ("TNF- α ", por sus siglas en inglés) en sobrenadantes libres de células se determinó mediante ELISA, respectivamente. ** $p < 0.01$, n.s. ninguna diferencia significativa.

La FIGURA 3A, FIGURA 3B, FIGURA 3C, FIGURA 3D, FIGURA 3E, FIGURA 3F, FIGURA 3G y FIGURA 3H muestran la generación de un vector BsAb-CAR que contiene tanto BCMA CAR como anticuerpo biespecífico (BsAb) anti-NKG2D-anti-CS1 en la misma construcción y el examen funcional de células T trasducidas con esta construcción. (FIGURA 3A) Representación esquemática de un vector lentiviral generado que expresa tanto BCMA CAR como BsAb anti-NKG2D-anti-CS1 (en lo sucesivo denominado BsAb-CAR). T2A, un gen 2A de autoescisión. (FIGURA 3B) Los sobrenadantes y los lisados celulares del vector vacío (EV)-células T trasducidas o células T BsAb-CAR se sometieron a análisis de inmunotransferencia con un anticuerpo anti-etiqueta 6x His. (FIGURA 3C) Se cocultivaron células MM1.S etiquetadas con ^{51}Cr (5×10^3) con células T no modificadas (T, línea continua negra), células T trasducidas con vector vacío (T EV, línea punteada negra) o células T BsAb-CAR (línea púrpura) en las relaciones de efector:objetivo ("E:T", por sus siglas en inglés) indicadas durante 4 horas, y se midió la lisis objetivo (liberación de ^{51}Cr). (FIGURA 3D) Se cocultivaron células T no modificadas (línea continua negra), células T EV (línea punteada negra), células T BsAb (línea roja), células

T BCMA CAR (línea continua verde) o células T CD8 (+) transducidas con BsAb-CAR (línea continua púrpura) aisladas de donantes sanos con células MM MM1.S etiquetadas con ^{51}Cr (5×10^3) en las relaciones E:T indicadas durante 4 horas, y se midió la lisis objetivo (liberación de ^{51}Cr). (FIGURA 3E) Ensayos de liberación de ^{51}Cr de 4 horas con células MM.1S MM en una relación E:T de 10:1. Para evaluar este efecto antitumoral en presencia de diferentes cantidades de PBMCs humanas normales (no infectadas), se añadieron PBMCs en una cantidad de 1, 10, 100 y 200 veces de las células objetivo MM.1S MM. (FIGURA 3F) Ensayos de liberación de ^{51}Cr de las células T no modificadas (cuadrado negro), las células T EV (cuadrado con patrón), células T BsAb (cuadrado rojo), células T BCMA-CAR (cuadrado verde), o células T BsAb-CAR (cuadrado púrpura) frente a células objetivo MM.1S MM en una relación E:T de 5:1. Como se indica en la figura, el tiempo de incubación de las células efectoras y las células objetivo MM.1S MM es de 4 horas para las células PBMC, NK y NKT (panel izquierdo) y de 16 horas para las células T CD3⁺, células T CD8⁺, células T V γ 9V δ 2 o células T CD4⁺. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, n.s. ninguna diferencia significativa. (FIGURA 3G) Control de cocultivo de células T EV (GFP, verde) y células MM.1S MM (rojo) después de 1 hora, se determinó el análisis de microscopía confocal de las sinapsis (escala 10 μL , panel superior; escala 20 μL , panel inferior); no se notan sinapsis, incluso a mayor potencia que se muestra en el panel inferior. (FIGURA 3H) Cocultivo de una hora de células T BsAb-CAR (E: GFP, verde) y células MM.1S MM (T: rojo); se observaron las sinapsis E/T e indicadas por las flechas en todos los cuadros (S1 muestra el mismo par E/T conjugado en cada cuadro moviéndose de izquierda a derecha, al igual que S2 y S3). El marco en la parte superior izquierda muestra un campo brillante (Bf, escala 10 μL); el marco superior, medio, muestra una imagen de inmunofluorescencia de cocultivo de células T BsAb-CAR (GFP, verde) y células MM.1S MM (rojo) (escala de 10 μL). El marco en la parte superior derecha es una imagen combinada con etiqueta anti-6x-His adicional que identifica el BsAb (azul, escala de 10 μL). Las tres filas inferiores muestran los tres conjugados E/T individuales (S1, S2 y S3) visualizados en un campo ampliado (escala de 20 μL).

La FIGURA 4A, FIGURA 4B, FIGURA 4C y FIGURA 4D muestran que la sobreexpresión de BCMA y CS1 en las células K562 desencadena una mayor citotoxicidad y secreción de citocinas después del reconocimiento por las células T BsAb-CAR. (FIGURA 4A) Análisis de citometría de flujo de células K562 que sobreexpresan CS1 y BCMA (K562-CS1-BCMA, sombra gris) o un control de vector vacío (K562-PCDH, línea negra sólida) después de que las células se tiñeron con anticuerpo CS1 (panel izquierdo) o BCMA (panel derecho) o control de isotipo IgG (línea punteada negra en cada panel). (FIGURA 4B) Citotoxicidad de células T transducidas con vector vacío (EV) o BsAb-CAR contra células K562-CS1-BCMA y K562-PCDH, determinada mediante ensayos de liberación de ^{51}Cr de 4 horas. Se incubaron células K562-CS1-BCMA o K562-PCDH con células T EV o células T BsAb-CAR en las

relaciones E:T indicadas. ** $p < 0.01$ (células K562-CS1-BCMA + T BsAb frente a células K562-PCDH + T BsAb). (FIGURA 4C) Se cultivaron células T EV o células T BsAb-CAR (1×10^5) solas o estimuladas con un número igual de células K562-CS1-BCMA o K562-PCDH. Se utilizaron sobrenadantes de cultivos para determinar la secreción de IFN- γ mediante ELISA. ** $p < 0.01$. (FIGURA 4D) Las células se trataron como en la (FIGURA 4C) y la secreción de IL-2 en sobrenadantes libres de células se determinó mediante ELISA. ** $p < 0.01$.

La **FIGURA 5A, FIGURA 5B, FIGURA 5C, FIGURA 5D y FIGURA 5E** muestran que el BsAb anti-NKG2D-anti-CS1 secretado mejora la proliferación de células T con CAR a través de la señalización de NKG2D. (FIGURA 5A) Color del medio después del cultivo de células T no modificadas (1), células T 2-EV (2), células T BsAb (3), células T BCMA CAR (4), células T BsAb-CAR (5) o células T sin exposición previa las células (6) (control de no proliferación) se muestran en el panel superior. El gráfico de barras proporciona análisis estadísticos del número total de células incluyendo 6 muestras individuales para cada grupo. ** $p < 0.01$ (grupo 5 frente a grupos 1, 2, 4 y grupo 3 frente a grupos 1, 2, 4). Para documentar la proliferación de células T o la falta de la misma, se utilizó el rastreador de células violeta y se mostró como una dilución de V450 que se muestra mediante histogramas en el panel inferior. (FIGURA 5B) Medio de cultivo de cinco días de células T no modificadas, células T EV y células T BCMA CAR en presencia o ausencia de sobrenadantes libres de células de células T BsAb-CAR de la (FIGURA 5A), designados como 1+, 2+, 4+ o 1, 2, 4, respectivamente. Se enumeraron las células y los datos se presentaron como un gráfico de barras (parte superior). ** $p < 0.01$ (4+ frente a 4, 2+ frente a 2, 1+ frente a 1). El rastreador de células violeta se mostró como una dilución de V450 que se muestra mediante histogramas en el panel inferior (parte inferior). (FIGURA 5C) Se muestra un medio de cultivo de dos días. Células T 1A no modificadas, células T 2A-EV, células T 3A-BsAb, células T 4A-BCMA CAR y células T 5A-BsAb-CAR. El día 0, se añadió anticuerpo de bloqueo NKG2D (20 $\mu\text{g/ml}$) al cultivo de 1B, 2B, 3B, 4B y 5B, mientras que se añadió un anticuerpo de control de isotipo no reactivo (20 $\mu\text{g/ml}$) a 1A, 2A, 3A, 4A y 5A). Debajo de estos pocillos se encuentra la tinción citométrica de flujo para CD3, NKG2D, fragmento de unión a antígeno ("Fab", por sus siglas en inglés) F(ab)_2 (que se indica con "Fab" que indica la expresión del CAR) y Ki67 para medir la proliferación celular. (FIGURA 5D) Se realizó un análisis de inmunotransferencia para determinar la fosforilación ("p", por su inicial en inglés) de la proteína AKT y la proteína AKT total de 1A---T no modificadas, 2A---T EV, 3A---T BsAb, 4A---T BCMA-CAR, y 5A---T BsAb-CAR, así como 1B---Células T no modificadas + bloqueo de NKG2D, 2A---T EV + bloqueo de NKG2D, 3A---T BsAb + bloqueo de NKG2D, 4A---T BCMA-CAR + bloqueo de NKG2D, y 5A---T BsAb-CAR + bloqueo de NKG2D. (FIGURA 5E) Las mismas células que se muestran en la (FIGURA 5C) (1A, 2A, 3A, 4A y 5A) también se cultivaron conjuntamente con células MM.1S MM durante 48 horas. Los análisis de citometría de flujo para evaluar la proliferación celular se realizaron como se describe anteriormente en la (FIGURA 5C).

- La **FIGURA 6A, FIGURA 6B y FIGURA 6C** muestran que el BsAb anti-NKG2D-anti-CS1 secretado mejora la supervivencia de las células T con CAR mediante la señalización de NKG2D *in vitro*. (FIGURA 6A) Se mostraron medios de cultivo de cinco días de 1---T No m. (No modificadas) + IL-2, 2---T EV + IL-2, 3---T BsAb + IL-2, 4---T BCMA-CAR + IL-2, 5---T BsAb-CAR + IL-2. Tinción de citometría de flujo para CD3 (1ª columna), F(ab)₂ (2ª columna) y Ki67 para observar la proliferación celular (3ª columna) y Anexina V/Sytox azul para observar la supervivencia celular (4ª columna). (FIGURA 6B) Se mostraron medios de cultivo de cinco días (sin IL-2) de 1---T no modificadas, 2---T EV, 3---T BsAb, 4 ---T BCMA-CAR y 5---T BsAb-CAR en el panel superior. Tinción por citometría de flujo para CD3 (1ª columna) y Ki67 (2ª columna) para detectar la proliferación celular. Se incluyó anexina V/Sytox azul para detectar la supervivencia celular (tercera columna). (FIGURA 6C) Se muestran análisis estadísticos de los porcentajes de CD3, células proliferativas Ki67, células vivas Anexina V(-)Sytox azul(-), células de apoptosis Anexina V(+) y células muertas Anexina V(+)Sytox azul(+). Prueba t múltiple, comparó cada grupo. ** $p < 0.01$.
- La **FIGURA 7A, FIGURA 7B, FIGURA 7C y FIGURA 7D** muestran que las células T BsAb-CAR transducidas tienen una mejor capacidad de proliferación y supervivencia que las células T BCMA-CAR y las células T de control *in vivo*. (FIGURA 7A) Diseño de inyección i.v. de células T no modificadas, células T EV, células T BCMA-CAR y células T BsAb-CAR en ratones NSG inmunodeficientes (a, parte superior). Los histogramas 3D (panel inferior, 1ª columna) indican los porcentajes de células T CD3 humanas inyectadas. Los histogramas azules son para los ratones que no recibieron una inyección de células T el día -1, los histogramas naranjas representan 1 día después de la inyección de células T y los histogramas negros representan 14 días después de la inyección de células T (la flecha roja señala el grupo T BsAb-CAR). Los contornos indican la expresión de CD69 (naranja para 1 día después de la inyección i.v., y negro para 14 días después de la inyección i.v.). Los histogramas de color púrpura (cuarta columna) indicaron porcentajes de células T CD3 inyectadas 35 días después de la administración i.v. Los contornos púrpuras son la combinación de tinción Ki67 y CD69 de 4 grupos para revelar la proliferación celular. Los contornos rojos son la combinación de tinción con Sytox azul y Anexina V para revelar la apoptosis celular y la muerte celular. S-/A- indica Sytox azul(-)/Anexina V(-), S-/A+ indica Sytox azul(-)/Anexina V+, y S+/A+ indica Sytox azul(+)/Anexina V+. (FIGURA 7B, FIGURA 7C) Análisis estadístico de células humanas CD3⁺ (FIGURA 7B) y CD69⁺ (FIGURA 7C) mostradas en la (FIGURA 7A). T no modificadas (rectángulo vacío), T EV (rectángulo relleno de patrón), T BCMA-CAR (rectángulo de sombra gris) y T BsAb-CAR (rectángulo negro). Prueba t múltiple, comparó cada grupo. ** $p < 0.01$, n.s. ninguna diferencia significativa, n = 5 ratones por grupo. (FIGURA 7D) Análisis estadístico de los porcentajes de células proliferativas Ki67⁺CD69⁺, células vivas Anexina V(-)Sytox azul(-), células de apoptosis Anexina V(+)Sytox azul(-) y células muertas Anexina V(+)Sytox azul(+).

Prueba t múltiple, comparó cada grupo. ** $p < 0.01$, n.s. ninguna diferencia significativa, n = 5/grupo.

La **FIGURA 8A**, **FIGURA 8B** y **FIGURA 8C** muestran que las células T BsAb-CAR reconocen y eliminan específicamente las células de mieloma múltiple primario humano que expresan CS1 y/o BCMA *ex vivo*. (FIGURA 8A) Tinción de superficie por citometría de flujo para la proteína CS1 y BCMA en células tumorales de mieloma múltiple CD138⁺ aisladas de médula ósea de pacientes con MM. Se muestran los resultados de 8 pacientes. Se tiñeron células MM de ocho pacientes con anticuerpo mAb anti-CS1 conjugado con ficoeritrina ("PE", por sus siglas en inglés) (panel izquierdo) o estreptavidina conjugada con alofococianina ("APC", por sus siglas en inglés) con mAb anti-BCMA marcado con biotina (panel derecho). Se utilizan varios colores para indicar cada uno de los 8 pacientes o el anticuerpo de control con el mismo isotipo (sombra gris). (FIGURA 8B) Se cocultivaron 5×10^3 células tumorales de mieloma múltiple CD138⁺ con células T EV (línea punteada negra), células T BsAb (línea roja), células T BCMA-CAR (línea verde), o células T BsAb-CAR (línea púrpura) en las relaciones E:T indicadas durante 4 horas, posteriormente se determinó la lisis específica usando un ensayo de liberación de ⁵¹Cr estándar. Se muestran los datos que representan la muestra del paciente 1 y la muestra del paciente 4. Se analizaron los datos de ocho pacientes y se mostraron como valores individuales para cada patente (panel derecho). (FIGURA 8C) Las células T transducidas como se indica se cultivaron conjuntamente con células tumorales de mieloma múltiple CD138⁺ en una relación E:T de 1:1 durante 24 horas, y se midió la secreción de IFN- γ en sobrenadantes libres de células mediante ELISA.

La **FIGURA 9A**, **FIGURA 9B** y **FIGURA 9C** muestran que los linfocitos T BsAb-CAR son superiores para suprimir el crecimiento de MM *in vivo* y prolongar la supervivencia de ratones que portan MM o que son reexpuestos a células tumorales. (FIGURA 9A) Se mostraron imágenes de bioluminiscencia para cinco ratones representativos que portaban tumores MM.1S de cada grupo indicado. Se inocularon por vía intravenosa ratones NSG con 8×10^6 células MM.1S que expresan luciferasa (día 0). En los días 10, 17 y 24 después de la implantación del tumor, cada ratón recibió una inyección i.v. con solución salina (grupo control) o, 10×10^6 células T EV, células T BsAb, células T BSMA CAR, células T trans. sec. BsAb-BCMA, o células T BsAb-CAR, respectivamente (panel superior, programa de experimentos). Las imágenes de la fila se tomaron el día 10 después de la implantación del tumor, justo antes de la infusión de células T modificadas genéticamente o células T de control. Las imágenes de la fila central se tomaron el día 24, después de que los ratones ya se habían sometido al tratamiento dos veces (el día 10, 17) y justo antes del tercer tratamiento. Las imágenes de la fila inferior muestran ratones el día 31, después de 3 rondas de tratamiento (los días 10, 17 y 24). (FIGURA 9B) El día 80 después de la implantación del tumor, se extrajo sangre periférica ("PBL", por sus siglas

en inglés) de los ratones supervivientes (3 ratones del grupo tratado con células T BCMA CAR, 4 ratones del grupo tratado con células T trans. sec. BsAb-BCMA, y 5 ratones del grupo tratado con células T BsAb-CAR). Se calcularon los números de células totales de PBL (panel izquierdo). Tinción por citometría de flujo con anticuerpo mAb anti-CD45 humano conjugado con isotiocinato de fluorescencia ("FITC", por sus siglas en inglés) y estreptavidina conjugada con APC con anticuerpo policlonal de cabra anti-ratón (Fab)₂ etiquetado con biotina o anticuerpo de inmunoglobulina G (IgG) de cabra policlonal normal. Los porcentajes de células Fab(+) y números se calcularon como se muestra en el medio. (FIGURA 9C) Curva de supervivencia de Kaplan-Meier de ratones portadores de MM.1S tratados con diversas células T transducidas, solución salina (línea continua negra), células T EV (línea punteada negra), células T BsAb (línea roja), células T BCMA CAR (línea verde), células T trans. sec. BsAb-BCMA (línea azul) y células T BsAb-CAR (línea punteada púrpura). La línea vertical punteada gris con flecha que indica el día 80 cuando los ratones se sometieron a reexposición con 4×10^6 células MM.1S.

La **FIGURA 10A, FIGURA 10B, FIGURA 10C y FIGURA 10D** muestran que las células T BsAb-CAR son más efectivas que las células T BCMA-CAR para suprimir *in vivo* el crecimiento de MM y prolongar la supervivencia de ratones portadores de tumores MM en presencia de PBMCs humanas transferidas adoptivamente. (FIGURA 10A) Se mostraron imágenes de bioluminiscencia para tres ratones representativos que portaban tumores MM.1S de cada grupo indicado. Se inocularon por vía intravenosa ratones NSG con 8×10^6 células MM.1S que expresan luciferasa (día 0). En los días 10, 17 y 24 después de la implantación del tumor, cada ratón recibió una inyección i.v. con solución salina (grupo control), células T BSMA-CAR, o células T BsAb-CAR. Se inyectaron i.v. PBMCs agotadas en células mieloides del mismo donante a ratones el día 10 después de la implantación del tumor (panel superior, programa de experimentos). Las imágenes de la primera columna se tomaron el día 10 después de la implantación del tumor, justo antes de la infusión de células T modificadas genéticamente o células T de control. Las imágenes de la segunda columna se tomaron el día 19, después de que los ratones ya se sometieran al tratamiento dos veces (el día 10, 17) y justo antes de que se administrara el tercer tratamiento. Las imágenes de la tercera columna muestran los ratones el día 28, después de 3 rondas de tratamiento (los días 10, 17 y 24). Las imágenes de la cuarta columna muestran los ratones el día 37. (FIGURA 10B) Se recolectó sangre de ratones inyectados con células T BsAb- CAR supervivientes (n = 5) y ratones NSG no tratados (ninguno, n = 5). Tinción por citometría de flujo para células plasmáticas humanas CD19/20(+), células NK CD56(+) y células T CD3(+). El color verde del contorno que se activó en CD3(+) F(ab)₂(+) humano indica el porcentaje de expresión de CAR dentro de las células T humanas supervivientes. (FIGURA 10C) Análisis estadístico de los porcentajes de células plasmáticas CD19/20(+), células NK CD56(+), células T CD3(+) y células T CD3(+)F(ab)₂(+) supervivientes. (FIGURA 10D) La curva de supervivencia de Kaplan-Meier de los ratones portadores de MM.1S

tratados con diversas células T transducidas, solución salina (línea sólida negra), células T BCMA-CAR (línea verde), o células T BsAb-CAR (línea punteada púrpura). $P < 0.0001$, células T BsAb-CAR frente a células T BCMA-CAR.

FIGURA 11A, FIGURA 11B, FIGURA 11C. (FIGURA 11A) El mapa citométrico de flujo de puntos arco iris 3D (básico en tinción CD3, las células CD3 positivas muestran el color amarillo y verde, y las células CD3 negativas muestran el color azul oscuro y violeta) muestra los porcentajes de células T CD3(+) (círculo negro, color amarillo con color verde), células T $\gamma\delta$ (sólo color amarillo), células NKT (círculo naranja, color amarillo con color verde), y células NK (círculo azul, color azul oscuro y violeta). Los mapas de contorno 2D muestran los detalles del mapa 3D. (FIGURA 11B) Tinción por citometría de flujo de la expresión de superficie de NKG2D en células T, células T CD8⁺, células T pan $\gamma\delta$, células T V γ 9V δ 2, células NKT y células NK. Los datos presentados son representativos de PBMCs de 10 donantes sanos. (FIGURA 11C) Análisis estadísticos de porcentajes de células NKG2D⁺ en la (FIGURA 11B). $n = 10$.

FIGURA 12A, FIGURA 12B. (FIGURA 12A) Ensayos de liberación de ^{51}Cr de 4 horas en la relación E:T de 10:1 [E, células efectoras de células T no modificadas (línea continua negra) o células T EV (línea punteada negra), T BsAb- (línea roja), T BCMA-CAR (línea verde), o T transducidas con BsAb-CAR (línea púrpura)]. Diferentes cantidades de PBMCs humanas en 1, 10, 100 o 200 veces más que las células objetivo. La curva de lisis específica de un experimento representativo de tres se muestra en la FIGURA 12A y los datos resumidos de tres se muestran en la FIGURA 12B. (FIGURA 12B) Análisis estadísticos de los resultados de los ensayos de liberación de ^{51}Cr de (FIGURA 12A), prueba t múltiple, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, n.s. Ninguna diferencia significativa, repetición de 3 veces.

FIGURA 13A, FIGURA 13B, FIGURA 13C, FIGURA 13D. (FIGURA 13A) Se aislaron células T CD3(+), células T citotóxicas CD8(+), células T CD4(+), células T $\gamma\delta$, células NKT y células NK de leucopacks encargados a la Cruz Roja Americana. El mapa de contorno de color negro para T cebadas muestra la tinción combinada de CD3 y TCR pan $\alpha\beta$. Los mapas de contorno de color marrón y verde muestran células T CD8(+) y CD4(+) clasificadas, respectivamente. (FIGURA 13B) Se tiñeron células NK humanas activadas con CD3 y CD56. (FIGURA 13C) Las células T pan $\gamma\delta$ clasificadas se tiñeron con CD3 y anticuerpos de TCR pan $\gamma\delta$. Los mapas de contorno de color negro para las células T de TCR V γ 9 $\gamma\delta$ 2 activadas se realizaron mediante tinción combinatoria de CD3, CD56, V γ 9 y V δ 2. (FIGURA 13D) Se tiñeron células NKT CD3(+)CD56(+) humanas recién clasificadas con análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia ("FACS", por sus siglas en inglés) con CD3 y CD56.

FIGURA 14A, FIGURA 14B, FIGURA 14C, FIGURA 14D, FIGURA 14E. (FIGURA 14A) ^{51}Cr ensayos de liberación de las células T no modificadas (línea de color negro sólido), células T EV (línea punteada negra), células T BsAb (línea roja), células T BCMA-CAR (línea verde) o

células T BsAb-CAR (línea púrpura) en una relación E:T de 5:1 en diferentes puntos de tiempo, incluyendo 2 h, 4 h, 8 h y 16 h. No se agregaron PBMCs adicionales. (FIGURA 14B, FIGURA 14C, FIGURA 14D, FIGURA 14E) Los ensayos de citotoxicidad descritos anteriormente se repitieron en presencia o ausencia de células T en masa o subconjuntos de células T individuales, incluyendo células T CD3(+) cebadas, células T CD8(+), células T CD4(+) células y células T V γ 9V δ 2. La proporción de células efectoras a las células MM.1S objetivo fue de 5:1 para todos los experimentos.

La **FIGURA 15A, FIGURA 15B, FIGURA 15C, FIGURA 15D, FIGURA 15E, FIGURA 15F, FIGURA 15G, FIGURA 15H, FIGURA 15I y FIGURA 15J** muestran un análisis microscópico confocal después de un cocultivo de 24 horas de células T BsAb-CAR (verde) o células T EV (verde) con células MM.1S MM (rojo). (FIGURA 15A, FIGURA 15B, FIGURA 15C, FIGURA 15D, FIGURA 15E, FIGURA 15F) El cocultivo de células T BsAb-CAR con células MM.1S MM durante 24 horas muestra la eliminación de células MM.1S MM. (FIGURA 15G, FIGURA 15H, FIGURA 15I, FIGURA 15J) El cocultivo de células T EV con células MM.1S MM durante 24 horas muestra la persistencia de células MM.1S MM. Bf = campo brillante, por sus siglas en inglés; Escala, 10 μ l.

La **FIGURA 16** muestra la generación de células K562 que expresan de manera estable los genes CS1 y BCMA. El mapa de flujo de pseudo color de la izquierda indica el control de las células K562 no transducidas. El mapa de flujo de pseudo color del medio indica células K562 infectadas con lentivirus pCDH-CS1-GFP clasificadas con FACS. El tercer mapa de flujo de pseudo color indica células K562 CS1(+)BCMA(+) clasificadas por FACS.

FIGURA 17A, FIGURA 17B, FIGURA 17C, FIGURA 17D. (FIGURA 17A) 48 horas de cultivo. Células T 1A no modificadas, células T 2A-EV, células T 3A-BsAb, células T 4A-BCMA CAR y células T 5A-BsAb-CAR. Tinción por citometría de flujo para CD3 y NKG2D para observar poblaciones de CD3(+) (llamas azules), poblaciones de CD3(+)NKG2D(+) (llama roja) y poblaciones de CD3(+)NKG2D(-) (llamas verdes). (FIGURA 17B) En el día 0, el anticuerpo de bloqueo de NKG2D (20 μ g/ml) se añadió en el cultivo de la (FIGURA 17A) y se nombró como 1B, 2B, 3B, 4B y 5B. Después de 48 horas, tinción citométrica de flujo para CD3 y F(ab)₂ para observar la población celular. Poblaciones de CD3(+) (llamas azules). (FIGURA 17C) Se mostraron los medios de cultivo de 48 horas de la (FIGURA 17A). En el día 0, el anticuerpo de bloqueo de CS1 (20 μ g/ml) se añadió en el cultivo de la (FIGURA 17A) y se nombró como 1C, 2C, 3C, 4C y 5C. Después de 48 horas, se realizó un análisis de citometría de flujo para teñir las células con anti-CD3, anti-F(ab)₂, anti-NKG2D y anti-Ki67 para observar las proliferaciones celulares. Las células se activaron en las poblaciones CD3(+) y CD3(+)NKG2D(+) (llama roja), se indicaron las poblaciones CD3(+)NKG2D(-) (llamas verdes). Los mapas de flujo de puntos de color rojo indicaron la proliferación de células NKG2D(+)Fab(+) (tres superiores) o

NKG2D(+)/Fab(-) (dos inferiores). Los mapas de flujo de puntos de color verde indican la proliferación de células NKG2D(-)/Fab(+) (tres superiores) o NKG2D(-)/Fab(-) (dos inferiores). Fab denota la formación de anti-F(ab)₂ para la expresión de CAR. (FIGURA 17D) Se cocultivaron células de 1A, 2A, 3A, 4A y 5A en la (FIGURA 17A) con células tumorales MM.1S durante 48 horas. Se realizaron análisis de citometría de flujo después de teñir las células con anticuerpos anti-CD3, anti-F(ab)₂ y anti-NKG2D. Fab denota tinción de F(ab)₂, que indica expresión de CAR.

La FIGURA 18 proporciona datos complementarios a los datos de la FIGURA 7A, FIGURA 7B, FIGURA 7C y FIGURA 7D. En la FIGURA 7A, FIGURA 7B, FIGURA 7C y FIGURA 7D, se muestran histogramas 3D (1ª columna) de porcentajes de células T CD3 humanas. Estos son los mapas de flujo de pseudo color originales. El marco de color azul indicó los porcentajes de CD3 humanos de los ratones que no recibieron inyección de células T el día -1 (1ª columna). El marco de color naranja representa células CD3(+) anti-humanas en ratones un día después de la inyección de células T, y la expresión de CAR se detectó mediante análisis de citometría de flujo después de teñir con anti-F(ab)₂ (2ª, 3ª columna). El marco de color negro muestra células CD3(+) anti-humanas en ratones 14 días después de la infusión con células T humanas modificadas o de control (4ª columna). El marco de color púrpura muestra células CD3(+) anti-humanas en ratones 35 días después de la infusión con células T humanas modificadas o de control (5ª columna). El análisis estadístico para células humanas CD3(+) se muestra en la FIGURA 7A, FIGURA 7B, FIGURA 7C y FIGURA 7D.

La FIGURA 19A y FIGURA 19B muestran los efectos del agotamiento de las células mieloides en PBMCs de donantes sanos humanos para evitar la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) cuando se inyectan en ratones NSG. (FIGURA 19A) Se tiñeron PBMCs humanas aisladas con Ficoll-Paque PLUS. El número 1 indicó los porcentajes de linfocitos, el 2 indicó los porcentajes de granulocitos y el 3 indicó los porcentajes de monocitos. Se tiñeron CD11c, CD14, CD33 y CD66b para comprobar los porcentajes de células mieloides en PBMCs de donantes sanos antes de clasificar mediante FACS. (FIGURA 19B) Después de la clasificación, se tiñeron CD11c, CD14, CD33 y CD66b como se describió anteriormente, se mostraron mapas de pseudo color bajo.

La FIGURA 20 proporciona una evaluación de la citotoxicidad de las células T BsAb-CAR humanas contra PBMCs, células T, células NK y células plasmáticas autólogas mediante un ensayo de liberación de ⁵¹Cr estándar de 4 h. Las PBMCs se aislaron mediante centrifugación en gradiente Ficoll-Paque PLUS. Las células T CD3(+), las células NK CD56(+) y las células plasmáticas CD19/20(+) se clasificaron mediante FACS a partir de las PBMCs. Se utilizaron células T EV como control en el ensayo de citotoxicidad.

FIGURA 21A, FIGURA 21B, FIGURA 21C, FIGURA 21D. (FIGURA 21A) Diferentes puntos de tiempo (12 h, 24 h, 48 h, 72 h y 96 h) de células T cebadas de donantes sanos

- infectadas con lentivirus BsAb BCMA-CAR (T BsAb-CAR). Se muestra la misma vista de GFP (verde) de BF (campo brillante). (FIGURA 21B) Inmunotransferencia con etiqueta anti-His para mostrar la secreción de BsAb en el sobrenadante de células T BsAb-CAR. (FIGURA 21C) Tinción por citometría de flujo para células T cebadas infectadas con lentivirus T BsAb-CAR. Se
- 5 clasificaron las células positivas para GFP y se tiñeron las células con anticuerpo específico de Fab de cabra anti-ratón marcado con biotina o anticuerpo de control emparejado con isotipo, seguido de tinción con estreptavidina y anticuerpo CD3. (FIGURA 21D) Las líneas celulares objetivo H929, RPMI-8226 y K562 etiquetadas con ^{51}Cr (5×10^3) se cocultivaron con células T no modificadas (línea continua negra), células T transducidas con vector vacío (T EV, línea
- 10 punteada negra), o células T BsAb-CAR (línea púrpura) en las relaciones E:T indicadas durante 4 horas. Se midió la lisis objetivo (liberación de ^{51}Cr). T BsAb-CAR frente a T no modificadas o T EV, ** $P < 0.01$, repetido tres veces. K562 BCMA(-)CS1(-) negativas actuaron como células objetivo de control negativo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 15 Debe entenderse que la presente descripción no se limita a aspectos particulares descritos, ya que, por supuesto, pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en la presente tiene el propósito de describir solamente aspectos particulares, y no pretende ser limitativa, ya que el alcance de la presente descripción estará limitado sólo por las reivindicaciones adjuntas. A lo largo de esta descripción, se hace referencia a varias
- 20 publicaciones técnicas mediante un número arábigo. Las citas completas de estas publicaciones se pueden encontrar inmediatamente antes de las reivindicaciones y se incorporan en la presente a modo de referencia.

- Se ha demostrado que tanto el antígeno de maduración de células B (BCMA) como SLAMF7 (CS1 o CD319) son excelentes objetivos de antígenos tumorales MM, mientras que
- 25 NKG2D es una excelente objetivo de células inmunes. NKG2D, un receptor, se expresa en prácticamente todas las células inmunes citolíticas, incluyendo las células NK, las células NKT, las células T CD8(+) y las células T $\gamma\delta$ ²³. BCMA es un miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral 17 ("TNFRSF17", por sus siglas en inglés) o CD269), se induce selectivamente durante
- 30 la diferenciación de las células plasmáticas y está casi ausente en las células B sin exposición previa y de memoria^{24,25}. La transferencia adoptiva de células T que expresan anti-BCMA-CAR se ha informado como una nueva estrategia prometedora para el tratamiento del MM²⁶⁻²⁸. CS1 es otro antígeno objetivo atractivo asociado a tumores en MM, debido a que CS1 se expresa de forma elevada y ubicua en la superficie de las células MM^{29,30}. CS1 se expresa a niveles bajos
- 35 en células NK y en un subconjunto de células T CD8(+) activadas, pero es casi indetectable en células mieloides y células madre hematopoyéticas normales³¹. La FDA aprobó un anticuerpo

monoclonal terapéutico contra CS1 para el tratamiento del MM³². La investigación publicada por el solicitante mostró que la modificación genética de las células T o células NK redirigidas hacia CS1 mejoró la erradicación de las células de mieloma^{29,30}. Un estudio preclínico reciente mostró que las células de MM de pacientes sometidos a tratamiento con células T CAR CS1 se erradicaron efectivamente, mientras que las células NK y T normales con niveles bajos de expresión de CS1 no se vieron afectadas (Gogishvili, 2017 Blood. 28 Dic 2017;130(26):2838-2847. doi: 10.1182/blood-2017-04-778423. Epub 31 Oct 2017). NKG2D, un receptor de activación, se expresa en diversas células citolíticas innatas y adaptativas como se mencionó anteriormente^{11,33}. La activación de NKG2D puede conducir a la activación de la inmunidad celular tanto innata como adaptativa³⁴.

Como se describe en la presente, los solicitantes modificaron células T para (1) expresar un CAR de segunda generación específico de BCMA, y (2) secretar simultáneamente un BsAb anti-NKG2D-anti-CS1. Estos datos sugieren que estas células, en lo sucesivo denominadas células T BsAb-CAR, representan una terapia prometedora para el MM recidivante y/o refractario, y pueden ser una plataforma adecuada para producir la inmunoterapia contra el cáncer a base de CAR de nueva generación.

Esta combinación de un CAR y un anticuerpo biespecífico a base de anti-NKG2D como un único vector transducido en células T aún no se ha descrito en la literatura. Los solicitantes han demostrado que este método genera células T (células T BsAb CAR) que funcionan como potentes células efectoras citolíticas contra tumores. En la presente se proporciona un ejemplo representativo de un CAR de células T que se dirige contra un objetivo bien conocido en el mieloma múltiple (MM), denominado BCMA, y el anticuerpo biespecífico anti-NKG2D reconoce el antígeno tumoral de MM bien descrito CS1 que lo acerca a cualquier célula efectora citolítica innata o adaptativa que porta el antígeno NKG2D. Sin embargo, en la presente se contempla la expansión a una variedad de CARs complementarios y anticuerpos biespecíficos a base de anti-NKG2D en un único vector para posteriormente infectar células T y NK para la eficacia anti-tumoral. Este método puede modificarse para cualquier número de antígenos tumorales, como se conoce en la técnica, por ejemplo, EGFRVIII; CD70, mesotelina, CD123, CD19, CEA, CD133, Her2, ver Townsend et al. (2018) J. Exp. & Clinical Cancer Res. 37:163.

Como se muestra en los ejemplos a continuación, un único vector que proporciona dos modalidades complementarias dirigidas contra dos antígenos asociados a tumores distintos en las células de MM, es superior a cualquiera de las modalidades solas y es superior al uso de las células T infectadas secuencialmente con las dos construcciones separadas, en donde una codifica el CAR y la otra codifica el anticuerpo biespecífico a base de anti-NKG2D. Además, cuando la célula T (infectada con el vector experimental que codifica tanto el CAR como el anticuerpo biespecífico a base de anti-NKG2D) encuentra la célula MM que expresa ambos antígenos, la célula T BsAb CAR se somete tanto a la proliferación como la supervivencia

mejorada *in vitro* e *in vivo* a través de la activación mediada por NKG2D. Tales resultados son completamente inesperados.

En resumen, los solicitantes construyeron células T BCMA CAR que también secretan anticuerpos biespecíficos anti-NKG2D-anti-CS1; estas células se dirigen efectivamente a las células de mieloma múltiple (MM) BCMA(+) y/o CS1(+). La secreción de anticuerpos biespecíficos anti-NKG2D-anti-CS1 por las células T BCMA CAR mejora tanto la proliferación de células T con CAR *in vitro* como la supervivencia y proliferación de células T con CAR *in vivo* a través de la activación mediada por NKG2D. Las células T BCMA CAR que secretan anticuerpos biespecíficos anti-NKG2D-anti-CS1 muestran una eficacia *in vitro* e *in vivo* significativamente mejor contra los objetivos de las células tumorales en comparación con las terapias individuales con T BCMA CAR o con las células T que secretan anticuerpos biespecíficos anti-NKG2D-anti-CS1 solos. Estos resultados se pueden generalizar a diversos CARs empleados de la misma manera.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen los mismos significados que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta tecnología. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente puede usarse en la práctica o análisis de la presente tecnología, a continuación se describen los métodos, dispositivos y materiales preferidos. Todas las publicaciones técnicas y de patentes citadas en la presente se incorporan en su totalidad en la presente a modo de referencia. Nada en la presente debe interpretarse como una admisión de que la presente tecnología no tiene derecho a ser anterior a dicha descripción en virtud de una invención anterior.

La práctica de la presente tecnología empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de cultivo de tejidos, inmunología, biología molecular, microbiología, biología celular y ADN recombinante, que se encuentran dentro del conocimiento de la técnica. Ver, por ejemplo, Green & Sambrook eds. (2012) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4^a edición; la serie de Ausubel et al. eds. (2015) *Current Protocols in Molecular Biology*; la serie *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); MacPherson et al. (2015) *PCR 1: A Practical Approach* (IRL Press at Oxford University Press); MacPherson et al. (1995) *PCR 2: A Practical Approach*; McPherson et al. (2006) *PCR: The Basics* (Garland Science); Harlow & Lane eds. (1999) *Antibodies, A Laboratory Manual*; Greenfield ed. (2014) *Antibodies, A Laboratory Manual*; Freshney (2010) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 6^a edición; Gait ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; patente de EE.UU. No. 4,683,195; Hames & Higgins eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Anderson (1999) *Nucleic Acid Hybridization*; Herdewijn ed. (2005) *Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications*; Hames & Higgins eds. (1984) *Transcription and Translation*; Buzdin & Lukyanov ed. (2007) *Nucleic Acids Hybridization: Modern Applications*; Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press (1986)); Grandi

ed. (2007) *In Vitro* Transcription and Translation Protocols, 2ª edición; Guisan ed. (2006) Immobilization of Enzymes and Cells; Perbal (1988) A Practical Guide to Molecular Cloning, 2ª edición; Miller & Calos eds, (1987) Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Cold Spring Harbor Laboratory); Makrides ed. (2003) Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells; 5 Mayer & Walker eds. (1987) Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Academic Press, London); Lundblad & Macdonald eds. (2010) Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, 4ª edición; y Herzenberg et al. eds (1996) Weir's Handbook of Experimental Immunology, 5ª edición; y las ediciones más recientes de cada uno de ellos disponibles en el momento de la presentación.

- 10 Todas las designaciones numéricas, por ejemplo, pH, temperatura, tiempo, concentración y peso molecular, incluyendo los rangos, son aproximaciones que se varían (+) o (-) en incrementos de 1.0 o 0.1, según corresponda, o alternativamente mediante una variación de +/- 15%, alternativamente 10%, alternativamente 5% o alternativamente 2%. Debe entenderse, aunque no siempre se indica explícitamente, que todas las designaciones
- 15 numéricas están precedidas por el término "aproximadamente". También debe entenderse, aunque no siempre se indica explícitamente, que los reactivos descritos en la presente son simplemente ejemplares y que se conocen equivalentes de los mismos en la técnica.

- Debe inferirse sin una recitación explícita y, a menos que se pretenda lo contrario, que cuando la presente tecnología se relaciona con un polipéptido, proteína, polinucleótido o anticuerpo, se pretende un equivalente o un biológicamente equivalente dentro del alcance de la presente tecnología.
- 20

Definiciones

- De la manera que se usan en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" pueden incluir referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "una célula" incluye una pluralidad de células, incluyendo mezclas de las mismas.
- 25

- De la manera que se usa en la presente, el término "animal" se refiere a organismos vertebrados multicelulares vivos, una categoría que incluye, por ejemplo, mamíferos y aves. El término "mamífero" incluye tanto mamíferos humanos como no humanos.
- 30

- Los términos "sujeto", "huésped", "individuo" y "paciente" se utilizan indistintamente en la presente para referirse a sujetos humanos y veterinarios, por ejemplo, humanos, animales, primates no humanos, perros, gatos, ovejas, ratones, caballos y vacas. En algunas modalidades, el sujeto es un humano.
- 35

- De la manera que se usa en la presente, el término "anticuerpo" se refiere colectivamente a inmunoglobulinas o moléculas similares a las inmunoglobulinas que incluyen a modo de ejemplo y sin limitación, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, combinaciones de las mismas y moléculas similares producidas durante una respuesta inmune en cualquier vertebrado, por

ejemplo, en mamíferos, tales como humanos, cabras, conejos y ratones, así como especies no mamíferas, tales como inmunoglobulinas de tiburón. A menos que se indique específicamente lo contrario, el término “anticuerpo” incluye inmunoglobulinas intactas y “fragmentos de anticuerpos” o “fragmentos de unión a antígenos” que se unen específicamente a una molécula de interés (o un grupo de moléculas de interés muy similares) con la exclusión sustancial de la unión a otras moléculas (por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que tienen una constante de unión para la molécula de interés que es al menos 10^3 M^{-1} mayor, al menos 10^4 M^{-1} mayor o al menos 10^5 M^{-1} mayor que una constante de unión para otras moléculas en una muestra biológica). El término “anticuerpo” también incluye formas modificadas genéticamente, tales como anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos murinos o humanizados que no son de primates), anticuerpos heteroconjugados (tales como anticuerpos biespecíficos). Ver también, Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.); Owen et al., *Kuby Immunology*, 7ª Ed., W.H. Freeman & Co., 2013; Murphy, *Janeway's Immunobiology*, 8ª Ed., Garland Science, 2014; Male et al., *Immunology* (Roitt), 8ª Ed., Saunders, 2012; Parham, *The Immune System*, 4ª Ed., Garland Science, 2014.

De la manera que se usa en la presente, el término “anticuerpo monoclonal” se refiere a un anticuerpo producido por un único clon de linfocitos B o por una célula en la que se han transfectado los genes de cadena ligera y pesada de un único anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales se producen mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, haciendo células híbridas formadoras de anticuerpos a partir de una fusión de células de mieloma con células inmunes del bazo. Los anticuerpos monoclonales incluyen anticuerpos monoclonales humanizados.

En términos de estructura de anticuerpos, una inmunoglobulina tiene cadenas pesadas (“H”, por sus siglas en inglés) y cadenas ligeras (“L”, por sus siglas en inglés) interconectadas por enlaces disulfuro. Hay dos tipos de cadenas ligeras, lambda (λ) y kappa (κ). Hay cinco clases principales de cadenas pesadas (o isotipos) que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA y IgE. Cada cadena pesada y ligera contiene una región constante y una región variable (las regiones también se conocen como “dominios”). En combinación, las regiones variables de cadena pesada y ligera se unen específicamente al antígeno. Las regiones variables de cadena ligera y pesada contienen una región de “marco” interrumpida por tres regiones hipervariables, también denominadas “regiones determinantes de complementariedad” o “CDRs”. Se ha definido el alcance de la región marco y las CDRs (ver Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, 1991, que se incorpora en la presente a modo de referencia). La base de datos de Kabat ahora se mantiene en línea. Las secuencias de las regiones marco de diferentes cadenas ligeras o pesadas están relativamente conservadas

dentro de una especie. La región marco de un anticuerpo, es decir, las regiones marco combinadas de las cadenas ligeras y pesadas constituyentes, adopta en gran medida una conformación de lámina β y las CDRs forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β . Por lo tanto, las regiones marco actúan para formar un andamiaje que proporciona el posicionamiento de las CDRs en la orientación correcta mediante interacciones no covalentes entre cadenas.

Las CDRs son principalmente responsables de unirse a un epítipo de un antígeno. Las CDR de cada cadena generalmente se denominan CDR1, CDR2 y CDR3, numeradas secuencialmente comenzando desde el extremo N-terminal, y también se identifican típicamente por la cadena en la que se encuentra la CDR particular (regiones de cadena pesada etiquetadas como “CDHR”, por sus siglas en inglés, y regiones de cadena ligera etiquetadas como “CDLR”, por sus siglas en inglés). Así, una CDHR3 es la CDR3 del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo en el que se encuentra, mientras que una CDLR1 es la CDR1 del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo en el que se encuentra. Por ejemplo, un anticuerpo de Troponina T (TNT) tendrá una región V_H específica y la secuencia de la región V_L única para el antígeno relevante de TNT y, por lo tanto, secuencias de CDR específicas. Los anticuerpos con diferentes especificidades (es decir, diferentes sitios de combinación para diferentes antígenos) tienen diferentes CDRs. Aunque son las CDRs las que varían de un anticuerpo a otro, sólo un número limitado de posiciones de aminoácidos dentro de las CDRs están directamente implicadas en la unión del antígeno. Estas posiciones dentro de las CDRs se denominan residuos determinantes de la especificidad (“SDRs”, por sus siglas en inglés).

De la manera que se usa en la presente, el término “antígeno” se refiere a un compuesto, composición o sustancia que puede unirse específicamente a los productos de inmunidad humoral o celular específica, tal como una molécula de anticuerpo o un receptor de células T. Los antígenos pueden ser cualquier tipo de molécula, incluyendo, por ejemplo, haptenos, metabolitos intermedios simples, azúcares (por ejemplo, oligosacáridos), lípidos y hormonas, así como macromoléculas, tales como carbohidratos complejos (por ejemplo, polisacáridos), fosfolípidos y proteínas. Las categorías comunes de antígenos incluyen, pero no se limitan a, antígenos virales, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, protozoos y otros antígenos parasitarios, antígenos tumorales, antígenos implicados en enfermedades autoinmunes, alergia y rechazo de injertos, toxinas y otros antígenos diversos.

De la manera que se usa en la presente, el término “dominio de unión a antígeno” se refiere a cualquier dominio de proteína o polipéptido que pueda unirse específicamente a un antígeno objetivo.

De la manera que se usa en la presente, el término “autólogo”, en referencia a células, se refiere a células que se aíslan y se infunden nuevamente en el mismo sujeto (receptor o huésped). “Alogénico” se refiere a células no autólogas.

De la manera que se usa en la presente, el término “célula B” se refiere a un tipo de linfocito en la inmunidad humoral del sistema inmune adaptativo. Las células B funcionan principalmente para producir anticuerpos, actúan como células presentadoras de antígenos, liberan citocinas y desarrollan células B de memoria después de la activación por interacción del antígeno. Las células B se distinguen de otros linfocitos, tales como las células T, por la presencia de un receptor de células B en la superficie celular. Las células B pueden aislarse u obtenerse de una fuente disponible comercialmente. Los ejemplos no limitativos de líneas de células B disponibles comercialmente incluyen las líneas AHH-1 (ATCC® CRL-8146™), BC-1 (ATCC® CRL-2230™), BC-2 (ATCC® CRL-2231™), BC-3 (ATCC® CRL-2277™), CA46 (ATCC® CRL-1648™), DG-75 [D.G.-75] (ATCC® CRL-2625™), DS-1 (ATCC® CRL-11102™), EB-3 [EB3] (ATCC® CCL-85™), Z-138 (ATCC #CRL-3001), DB (ATCC CRL-2289), Toledo (ATCC CRL-2631), Pfiffer (ATCC CRL-2632), SR (ATCC CRL-2262), JM-1 (ATCC CRL-10421), NFS-5 C-1 (ATCC CRL-1693); NFS-70 C10 (ATCC CRL-1694), NFS-25 C-3 (ATCC CRL-1695), y SUP-B15 (ATCC CRL-1929). Otros ejemplos incluyen, entre otros, líneas celulares derivadas de linfomas anaplásicos y de células grandes, por ejemplo, DEL, DL-40, FE-PD, JB6, Karpas 299, Ki-JK, Mac-2A Ply1, SR-786, SU-DHL-1, -2, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10 y -16, DOHH-2, NU-DHL-1, U-937, Granda 519, USC-DHL-1, RL; linfomas de Hodgkin, por ejemplo, DEV, HD-70, HDLM-2, HD-MyZ, HKB-1, KM-H2, L 428, L 540, L1236, SBH-1, SUP-HD1, SU/RH-HD-I. Las fuentes ejemplares no limitativas para tales líneas celulares disponibles comercialmente incluyen la American Type Culture Collection, o ATCC, (<http://www.atcc.org/>) y la German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (<https://www.dsmz.de/>).

De la manera que se usa en la presente, un “cáncer” es un estado de enfermedad caracterizado por la presencia en un sujeto de células que demuestran una replicación anormal incontrolada y, en algunos aspectos, el término puede usarse indistintamente con el término “tumor”. El término “antígeno canceroso o tumoral” se refiere a un antígeno que se sabe que está asociado y se expresa en la superficie con una célula cancerosa o una célula o tejido tumoral, y el término “anticuerpo dirigido al cáncer o tumor” se refiere a un anticuerpo que se dirige a dicho antígeno.

El término “receptor de antígeno quimérico” (CAR), de la manera que se usa en la presente, se refiere a una proteína fusionada que comprende un dominio extracelular capaz de unirse a un antígeno, un dominio transmembrana derivado de un polipéptido diferente de un polipéptido del que se deriva el dominio extracelular, y al menos un dominio intracelular. El “receptor de antígeno quimérico (CAR)” a veces se denomina “receptor quimérico”, “cuerpo T” o “receptor inmune quimérico (“CIR”, por sus siglas en inglés)”. El “dominio extracelular capaz de unirse a un antígeno” significa cualquier oligopéptido o polipéptido que pueda unirse a un determinado antígeno. El “dominio intracelular” o “dominio de señalización intracelular” significa cualquier oligopéptido o polipéptido conocido por funcionar como un dominio que transmite una

CTCGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCG

15 Dominio transmembrana: Secuencia de codificación de la región transmembrana de CD28:

Dominio intracelular: Secuencia de codificación de la región de señalización reguladora de 4-1BB:

Dominio intracelular: Secuencia de codificación de la región de señalización reguladora de CD28:

Dominio intracelular: Secuencia de codificación de la región de señalización de CD3

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAA
CCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAG
ACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGC
CTGTACAATGAAGTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAA
35 GGCAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCA
CCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA

Otras modalidades de cada componente de dominio ejemplar incluyen otras proteínas que tienen una función biológica análoga que comparten al menos 70%, o alternativamente al menos 80% de identidad de secuencia de aminoácidos, preferiblemente 90% de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos 95% de identidad de secuencia con las proteínas codificadas por las secuencias de ácido nucleico descritas anteriormente. Además, en la presente se proporcionan ejemplos no limitativos de tales dominios.

De la manera que se usa en la presente, el término “dominio de bisagra de CD8 α ” se refiere a un fragmento de proteína específico asociado con este nombre y cualquier otra molécula que tenga una función biológica análoga que comparta al menos 70%, o alternativamente al menos 80% de identidad de secuencia de aminoácidos, preferiblemente 90% de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia del dominio de bisagra de CD8 α como se muestra en la presente. Las secuencias de ejemplo del dominio de bisagra de CD8 α para humanos, ratones y otras especies se proporcionan en Pinto, RD et al. (2006) Vet. Immunol. Immunopathol. 110:169-177. Las secuencias asociadas con el dominio de bisagra de CD8 α se proporcionan en Pinto, RD et al. (2006) Vet. Immunol. Immunopathol. 110:169-177. Ejemplos no limitativos de tales incluyen:

Dominio de bisagra de CD8 alfa humano:

PAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIY

Dominio de bisagra de CD8 alfa de ratón:

KVNSTTTKPVLRTSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFACDIY

Dominio de bisagra de CD8 alfa de gato:

PVKPTTTPAPRPPTQAPITTSQRVSLRPGTCQPSAGSTVEASGLDLSCDIY

De la manera que se usa en la presente, el término “dominio transmembrana de CD8 α ” se refiere a un fragmento de proteína específico asociado con este nombre y cualquier otra molécula que tenga una función biológica análoga que comparta al menos 70%, o alternativamente al menos 80% de identidad de secuencia de aminoácidos, preferiblemente 90% de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia del dominio transmembrana de CD8 α como se muestra en la presente. Las secuencias de fragmentos asociadas con las posiciones de aminoácidos 183 a 203 de la cadena alfa de la glucoproteína CD8 de la superficie de células T humanas (No. de acceso de GenBank: NP_001759.3), o las posiciones de los aminoácidos 197 a 217 de la cadena alfa de la glucoproteína CD8 de la superficie de las células T de ratón (No. de acceso de GenBank: NP_001074579.1), y las posiciones de aminoácidos 190 a 210 de la cadena alfa de la glucoproteína CD8 de la superficie de células T de rata (No. de acceso de GenBank: NP_113726.1) proporcionan ejemplos de secuencias adicionales del dominio transmembrana de CD8 α . Las secuencias asociadas con cada uno de los números de acceso enumerados se proporcionan a continuación:

Dominio transmembrana de CD8 alfa humano: IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT

Dominio transmembrana de CD8 alfa de ratón: IWAPLAGICVALLLSLIITLI

Dominio transmembrana de CD8 alfa de rata: IWAPLAGICAVLLLSLVITLI

De la manera que se usa en la presente, el término “dominio transmembrana de CD28” se refiere a un fragmento de proteína específico asociado con este nombre y cualquier otra molécula que tenga una función biológica análoga que comparta al menos 70%, o alternativamente al menos 80% de identidad de secuencia de aminoácidos, al menos 90% de identidad de secuencia, o alternativamente al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia del dominio transmembrana de CD28 como se muestra en la presente. Las secuencias de fragmentos asociadas con los números de acceso de GenBank: XM_006712862.2 y XM_009444056.1 proporcionan secuencias de ejemplo adicionales, no limitativas, del dominio transmembrana de CD28. Las secuencias asociadas con cada uno de los números de acceso enumerados se proporcionan en la presente.

De la manera que se usa en la presente, el término “región de señalización coestimuladora de 4-1BB” se refiere a un fragmento de proteína específico asociado con este nombre y cualquier otra molécula que tenga una función biológica análoga que comparta al menos 70%, o alternativamente al menos 80% de identidad de secuencia de aminoácidos, preferiblemente 90% de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de la región de señalización coestimuladora de 4-1BB como se muestra en la presente. Las secuencias de ejemplo no limitativas de la región de señalización coestimuladora de 4-1BB se proporcionan en la publicación de EE.UU. 20130266551A1 (presentada como la solicitud de EE.UU. No. 13/826,258), tal como la secuencia ejemplar proporcionada a continuación:

Región de señalización coestimuladora de 4-1BB:

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL

De la manera que se usa en la presente, el término “región de señalización coestimuladora de CD28” se refiere a un fragmento de proteína específico asociado con este nombre y cualquier otra molécula que tenga una función biológica análoga que comparta al menos 70%, o alternativamente al menos 80% de identidad de secuencia de aminoácidos, preferiblemente 90% de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de la región de señalización coestimuladora de CD28 como se muestra en la presente. Las secuencias de ejemplo del dominio de señalización coestimulador de CD28 se proporcionan en la Patente de EE.UU. No. 5,686,281; Geiger, T.L. et al., Blood 98: 2364-2371 (2001); Hombach, A. et al., J Immunol 167: 6123-6131 (2001); Maher, J. et al. Nat Biotechnol 20: 70-75 (2002); Haynes, N.M. et al., J Immunol 169: 5780-5786 (2002); Haynes, N.M. et al., Blood 100: 3155-3163 (2002). Los ejemplos no limitativos incluyen los residuos 114-220 de la siguiente secuencia CD28: MLRLLLALNL FPSIQVTGNK

ILVKQSPMLV AYDNAVNLSK KYSYNLFSRE FRASLHKGLDSAVEVCVVYV NYSQQQLQVYS
KTGFNCDGKL GNESVTFYLQ NLYVNQTDIY FCKIEVMYPPPYLDNEKSNG TIIHVKGKHL
CPSPLFPGPS KPFWVLVVVG GVLACYSLLVTVAFIIFWVR SKRSRLLHSD YMNMTPRRPG
PTRKHYQPYA PPRDFAAYRS, y equivalentes de los mismos.

5 De la manera que se usa en la presente, el término “región de señalización coestimuladora de coestimulador de células T inducible” (“ICOS”, por sus siglas en inglés) se refiere a un fragmento de proteína específico asociado con este nombre y cualquier otra molécula que tenga una función biológica análoga que comparta al menos 70%, o
10 90% de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de la región de señalización coestimuladora de ICOS como se muestra en la presente. Las secuencias de ejemplo no limitativas de la región de señalización coestimuladora de ICOS se proporcionan en la publicación de EE.UU. 2015/0017141A1, la secuencia de polinucleótidos ejemplar que se proporciona a continuación.

15 Secuencia de codificación de la región de señalización coestimuladora de ICOS:

acaaaaaaga agtattcatc cagtgtgcac gaccctaacg gtgaatacat gtcatgaga gcagtgaaca
cagccaaaaa atccagactc acagatgtga cccta

De la manera que se usa en la presente, el término “región de señalización coestimuladora de OX40” se refiere a un fragmento de proteína específico asociado con este nombre y cualquier otra molécula que tenga una función biológica análoga que comparta al
20 menos 70%, o alternativamente al menos 80% de identidad de secuencia de aminoácidos, o alternativamente 90% de identidad de secuencia, o alternativamente al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de la región de señalización coestimuladora de OX40 como se muestra en la presente. Las secuencias de ejemplo no limitativas de la región de señalización
25 coestimuladora de OX40 se describen en la publicación de EE.UU. 2012/20148552A1, e incluyen la secuencia de ejemplo proporcionada a continuación.

Secuencia de codificación de la región de señalización coestimuladora de OX40:

AGGGACCAG AGGCTGCCCC CCGATGCCCA CAAGCCCCCT GGGGGAGGCA
GTTTCCGGAC CCCCATCCAA GAGGAGCAGG CCGACGCCCA CTCCACCCTG
30 GCCAAGATC, y sus equivalentes.

De la manera que se usa en la presente, el término “región de señalización coestimuladora de CD28” se refiere a un fragmento de proteína específico asociado con este nombre y cualquier otra molécula que tenga una función biológica análoga que comparta al
35 menos 70%, o alternativamente al menos 80% de identidad de secuencia de aminoácidos, o alternativamente 90% de identidad de secuencia, o alternativamente al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de la región de señalización coestimuladora de CD28 mostrada en la presente. Las secuencias de ejemplo del dominio de señalización coestimulador de CD28

se proporcionan en la Patente de EE.UU. No. 5,686,281; Geiger, T.L. et al. (2001) Blood 98: 2364-2371; Hombach, A. et al. (2001) J Immunol 167: 6123-6131; Maher, J. et al. (2002) Nat Biotechnol 20: 70-75; Haynes, N.M. et al. (2002) J Immunol 169: 5780-5786 (2002); Haynes, N.M. et al. (2002) Blood 100: 3155-3163. Los ejemplos no limitativos incluyen los residuos 114-

5 220 a continuación y la secuencia codificada:
 Secuencia de CD28: MLRLLALNL FPSIQVTGNK ILVKQSPMLV AYDNAVNLSC
 KYSYNLFSRE FRASLHKGLDSAVEVCVVYG NYSQQLQVYS KTGFNCDGKL GNESTVFYQLQ
 NLYVNQTDIY FCKIEVMYPPPYLDNEKSNG TIIHVKGKHL CPSPLFPGPS KPFWVLVVVG
 GVLACYSLLVTVAFIIFWVR SKRSRLLHSD YMNMTPRRPG PTRKHYQPYA PPRDFAAYRS, y
 10 equivalentes de los mismos.

De la manera que se usa en la presente, el término “dominio de señalización de CD3 zeta” se refiere a un fragmento de proteína específico asociado con este nombre y cualquier otra molécula que tenga una función biológica análoga que comparta al menos 70%, o
 15 90% de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia del dominio de señalización de CD3 zeta como se muestra en la presente. Las secuencias de ejemplo no limitativas del dominio de señalización de CD3 zeta se proporcionan en la solicitud de EE.UU. No. 13/826,258, por ejemplo:
 20 RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN
 ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

De la manera que se usa en la presente, el término NKG2D se refiere a un receptor de activación que recientemente ha generado un interés considerable. Se han identificado varios ligandos objetivo de NKG2D. Las más intrigantes de ellas son un par de proteínas estrechamente relacionadas denominadas MICA y MICB (por las siglas en inglés de “proteínas
 25 A y B relacionadas con la cadena del complejo principal de histocompatibilidad (“MHC”, por sus siglas en inglés) de clase I”).

De la manera que se usa en la presente, el término ULBP se refiere a un miembro de la familia de proteínas de unión a eUL16.

Una “composición” típicamente significa una combinación del agente activo, por
 30 ejemplo, un compuesto o composición, y un portador de origen natural o no natural, inerte (por ejemplo, un agente detectable o etiqueta) o activo, tal como un adyuvante, diluyente, aglutinante, estabilizador, soluciones amortiguadoras, sales, disolventes lipófilos, conservadores, adyuvantes o similares, e incluyen portadores farmacéuticamente aceptables. Los portadores también incluyen excipientes farmacéuticos y aditivos de proteínas, péptidos,
 35 aminoácidos, lípidos y carbohidratos (por ejemplo, azúcares, incluyendo monosacáridos, di-, tri-, tetra-oligosacáridos y oligosacáridos; azúcares derivatizados, tales como alditoles, ácidos aldónicos, azúcares esterificados y similares; y polisacáridos o polímeros de azúcar), que

pueden estar presentes solos o en combinación, comprendiendo solos o en combinación 1-99.99% en peso o volumen. Los excipientes de proteína ejemplares incluyen albúmina sérica, tal como albúmina sérica humana ("HSA", por sus siglas en inglés), albúmina humana recombinante ("rHA", por sus siglas en inglés), gelatina, caseína y similares. Los componentes

5 de aminoácidos/anticuerpos representativos, que también pueden funcionar en una capacidad amortiguadora, incluyen alanina, arginina, glicina, arginina, betaína, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico, cisteína, lisina, leucina, isoleucina, valina, metionina, fenilalanina, aspartamo y similares. Los excipientes de carbohidratos también están previstos dentro del alcance de esta

10 tecnología, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a, monosacáridos, tales como fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa y similares; disacáridos, tales como lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa y similares; polisacáridos, tales como rafinosa, melezitosa, maltodextrinas, dextranos, almidones y similares; y alditoles, tales como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol sorbitol (glucitol) y mioinositol.

De la manera que se usa en la presente, el término "comprende" pretende significar que

15 las composiciones y métodos incluyen los elementos enumerados, pero no excluyen otros. "Consistente esencialmente en", cuando se usa para definir composiciones y métodos, significará excluir otros elementos de cualquier importancia esencial para la combinación para el uso previsto. Por ejemplo, una composición que consiste esencialmente en los elementos como se definen en la presente no excluiría trazas de contaminantes del método de aislamiento

20 y purificación y portadores farmacéuticamente aceptables, tales como solución salina amortiguada con fosfato, conservadores y similares. "Consistente en" significará excluir más que elementos traza de otros ingredientes y pasos sustanciales del método para administrar las composiciones descritas en la presente. Los aspectos definidos por cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance de la presente descripción.

25 De la manera que se usa en la presente, el término "secuencia consenso" se refiere a una secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos que se determina alineando una serie de secuencias múltiples y que define una secuencia idealizada que representa la elección predominante de aminoácido o base en cada posición correspondiente de la múltiples secuencias. Dependiendo de las secuencias de la serie de secuencias múltiples, la secuencia

30 consenso para la serie puede diferir de cada una de las secuencias en cero, una, unas pocas o más sustituciones. Además, dependiendo de las secuencias de la serie de secuencias múltiples, se puede determinar más de una secuencia consenso para la serie. La generación de secuencias de consenso se ha sometido a un análisis matemático intensivo. Se pueden utilizar varios programas de software para determinar una secuencia de consenso.

35 De la manera que se usa en la presente, el término "CRISPR" se refiere a una técnica de manipulación genética específica de secuencia que se basa en la ruta de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas ("CRISPR", por su siglas en

inglés). Se puede utilizar CRISPR para realizar la edición de genes y/o la regulación de genes, así como para dirigir simplemente proteínas a una ubicación genómica específica. La edición de genes se refiere a un tipo de modificación genética en la que la secuencia de nucleótidos de un polinucleótido objetivo se cambia mediante la introducción de deleciones, inserciones o sustituciones de bases en la secuencia de polinucleótidos. En algunos aspectos, la edición de genes mediada por CRISPR utiliza las vías de unión de extremos no homólogos (“NHEJ”, por sus siglas en inglés) o recombinación homóloga para realizar las ediciones. La regulación de genes se refiere a aumentar o disminuir la producción de productos génicos específicos, tales como proteínas o ARN.

De la manera que se usa en la presente, el término “ARNg” o “ARN guía” se refiere a las secuencias de ARN guía utilizadas para dirigirse a genes específicos para la corrección empleando la técnica CRISPR. Las técnicas de diseño de ARNg y polinucleótidos terapéuticos de donantes para la especificidad del objetivo son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, Doench, J., et al. *Nature biotechnology* 2014; 32(12):1262-7, Mohr, S. et al. (2016) *FEBS Journal* 283: 3232-38, y Graham, D., et al. *Genome Biol.* 2015; 16: 260. El ARNg comprende o alternativamente consiste esencialmente en, o además consiste de un polinucleótido de fusión que comprende ARN de CRISPR (“crRNA”, por sus siglas en inglés) y ARN de CRIPSPR de activación de trans (“tracrRNA”, por sus siglas en inglés); o un polinucleótido que comprende ARN de CRISPR (crRNA) y ARN de CRIPSPR de activación de trans (tracrRNA). En algunos aspectos, un ARNg es sintético (Kelley, M. et al. (2016) *J of Biotechnology* 233 (2016)74-83). De la manera que se usa en la presente, un equivalente biológico de un ARNg incluye, pero no se limita a, polinucleótidos o moléculas de dirección que pueden guiar una proteína asociada a CRISPR 9 (“Cas9”, por sus siglas en inglés) o equivalente de la mismo a una secuencia de nucleótidos específica, tal como una región específica del genoma de una célula.

De la manera que se usa en la presente, “terapia citorreductora” incluye, pero no se limita a, quimioterapia, crioterapia y radioterapia. Los agentes que actúan para reducir la proliferación celular son conocidos en la técnica y se usan ampliamente. Los fármacos de quimioterapia que destruyen las células cancerosas sólo cuando se están dividiendo se denominan específicos del ciclo celular. Estos medicamentos incluyen agentes que actúan en la fase S, incluyendo los inhibidores de la topoisomerasa y los antimetabolitos.

Los inhibidores de la topoisomerasa son fármacos que interfieren con la acción de las enzimas topoisomerasas (topoisomerasa I y II). Durante el proceso de los tratamientos de quimioterapia, las enzimas topoisomerasas controlan la manipulación de la estructura del ADN necesaria para la replicación y, por lo tanto, son específicas del ciclo celular. Los ejemplos de inhibidores de la topoisomerasa I incluyen los análogos de camptotecán enumerados anteriormente, irinotecán y topotecán. Los ejemplos de inhibidores de la topoisomerasa II incluyen amsacrina, etopósido, fosfato de etopósido y tenipósido.

Los antimetabolitos suelen ser análogos de sustratos metabólicos normales, y a menudo interfieren con los procesos implicados en la replicación cromosómica. Atacan células en fases muy específicas del ciclo. Los antimetabolitos incluyen antagonistas del ácido fólico, por ejemplo, metotrexato; antagonista de pirimidina, por ejemplo, 5-fluorouracilo, flouxuridina, citarabina, capecitabina y gemcitabina; antagonista de purina, por ejemplo, 6-mercaptopurina y 6-tioguanina; inhibidores de adenosina desaminasa, por ejemplo, cladribina, fludarabina, nelarabina y pentostatina; y similares.

Los alcaloides vegetales se derivan de ciertos tipos de plantas. Los alcaloides de la vinca están hechos de la planta del bigaro (*Catharanthus rosea*). Los taxanos están hechos de la corteza del árbol del tejo del Pacífico (taxus). Los alcaloides y taxanos de la vinca también se conocen como agentes antimicrotúbulos. Las podofilotoxinas se derivan de la planta del podofilo. Los análogos de camptotecán se derivan del “árbol de la felicidad” asiático (*Camptotheca acuminata*). Las podofilotoxinas y los análogos de camptotecán también se clasifican como inhibidores de la topoisomerasa. Los alcaloides vegetales son generalmente específicos del ciclo celular.

Los ejemplos de estos agentes incluyen alcaloides de la vinca, por ejemplo, vincristina, vinblastina y vinorelbina; taxanos, por ejemplo, paclitaxel y docetaxel; podofilotoxinas, por ejemplo, etopósido y teniposida; y análogos de camptotecán, por ejemplo, irinotecán y topotecán.

La crioterapia incluye, pero no se limita a, terapias que implican disminuir la temperatura, por ejemplo, terapia hipotérmica.

La radioterapia incluye, pero no se limita a, exposición a radiación, por ejemplo, radiación ionizante, radiación UV, como se conoce en la técnica. Las dosis ejemplares incluyen, pero no se limitan a, una dosis de radiación ionizante en un rango de al menos aproximadamente 2 Gy a no más de aproximadamente 10 Gy y/o una dosis de radiación ultravioleta en un rango de al menos aproximadamente 5 J/m² a no más de aproximadamente 50 J/m², normalmente aproximadamente 10 J/m².

De la manera que se usa en la presente, el término “marcador detectable” se refiere a al menos un marcador capaz de producir directa o indirectamente una señal detectable. Una lista no exhaustiva de este marcador incluye enzimas que producen una señal detectable, por ejemplo, por colorimetría, fluorescencia, luminiscencia, tales como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; cromóforos, tales como colorantes fluorescentes, luminiscentes; grupos con densidad electrónica detectada por microscopía electrónica o por sus propiedades eléctricas, tales como conductividad, amperometría, voltamperometría, impedancia; grupos detectables, por ejemplo, cuyas moléculas son de tamaño suficiente para inducir modificaciones detectables en sus propiedades físicas y/o químicas, tales como en donde la detección se puede realizar mediante métodos

ópticos como difracción, resonancia de plasmones superficiales, variación de superficie, cambio de ángulo de contacto o métodos físicos, tales como espectroscopia de fuerza atómica, efecto túnel o moléculas radiactivas, tales como ^{32}P , ^{35}S o ^{125}I .

Una “cantidad efectiva” o “cantidad eficaz” se refiere a la cantidad de un agente, o
 5 cantidades combinadas de dos o más agentes, que, cuando se administra para el tratamiento de un mamífero u otro sujeto, es suficiente para efectuar dicho tratamiento para la enfermedad.. La “cantidad efectiva” variará dependiendo del agente o agentes, la enfermedad y su gravedad, y la edad, peso, etc., del sujeto a tratar.

El término “codificar”, tal como se aplica a secuencias de ácidos nucleicos, se refiere a
 10 un polinucleótido que se dice que “codifica” un polipéptido si, en su estado nativo o cuando se manipula mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, puede transcribirse y/o traducirse para producir el ARNm del polipéptido y/o un fragmento del mismo. La cadena antisentido es el complemento de dicho ácido nucleico, y la secuencia de codificación puede deducirse de ella.

De la manera que se usa en la presente, el término “potenciador” denota elementos de
 15 secuencia que aumentan, potencian o mejoran la transcripción de una secuencia de ácido nucleico independientemente de su ubicación y orientación en relación con la secuencia de ácido nucleico que se va a expresar. Un potenciador puede potenciar la transcripción de un único promotor o simultáneamente de más de un promotor. Siempre que esta funcionalidad de
 20 mejorar la transcripción se retenga o se retenga sustancialmente (por ejemplo, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95% de la actividad de tipo silvestre, es decir, actividad de una secuencia de longitud completa), cualquier variante truncada, mutada o modificada de otra manera de una secuencia potenciadora de tipo silvestre también está dentro de la definición anterior.

En un aspecto, el término “equivalente” o “equivalente biológico” de un anticuerpo
 25 significa la capacidad del anticuerpo para unirse selectivamente a su proteína epítipo o fragmento de la misma medida por ELISA u otros métodos adecuados. Los anticuerpos biológicamente equivalentes incluyen, pero no se limitan a, aquellos anticuerpos, péptidos, fragmentos de anticuerpos, variantes de anticuerpos, derivados de anticuerpos y miméticos de
 30 anticuerpos que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia.

Debe inferirse sin una recitación explícita y, a menos que se pretenda lo contrario, que
 cuando la presente descripción se relaciona con un polipéptido, proteína, polinucleótido o anticuerpo, se pretende un equivalente o un biológicamente equivalente dentro del alcance de esta descripción. De la manera que se usa en la presente, el término “equivalente biológico del
 35 mismo” pretende ser sinónimo de “equivalente del mismo” cuando se refiere a una proteína, anticuerpo, polipéptido o ácido nucleico de referencia, se refiere a aquellos que tienen una homología mínima mientras aún mantienen la estructura o funcionalidad deseada. A menos que

se indique específicamente en la presente, se contempla que cualquier polinucleótido, polipéptido o proteína mencionado en la presente también incluya equivalentes de los mismos. Por ejemplo, un equivalente significa al menos aproximadamente un 70% de homología o identidad, o al menos un 80% de homología o identidad, o alternativamente al menos aproximadamente un 85%, o alternativamente al menos aproximadamente un 90%, o alternativamente al menos aproximadamente un 95%, o alternativamente 98% de homología o identidad, y exhibe una actividad biológica sustancialmente equivalente a la proteína, polipéptido o ácido nucleico de referencia. Alternativamente, cuando se hace referencia a polinucleótidos, un equivalente del mismo es un polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas con el polinucleótido de referencia o su complemento.

Una región polinucleotídica o polinucleotídica (o una región polipeptídica o polipeptídica) que tiene un cierto porcentaje (por ejemplo, 80%, 85%, 90% o 95%) de "identidad de secuencia" con otra secuencia significa que, cuando se alinea, ese porcentaje de bases (o aminoácidos) son iguales al comparar las dos secuencias. La alineación y el porcentaje de homología o identidad de secuencia se pueden determinar utilizando programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos en Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., Eds. 1987) Suplemento 30, sección 7.7.18, tabla 7.7.1. Preferiblemente, los parámetros predeterminados se usan para la alineación. Un programa de alineación preferido es BLAST, que utiliza parámetros predeterminados. En particular, los programas preferidos son BLASTN y BLASTP, utilizando los siguientes parámetros predeterminados: Código genético = estándar; filtro = ninguno; cadena = ambas; corte = 60; esperar = 10; Matriz = BLOSUM62; Descripciones = 50 secuencias; ordenar por = CALIFICACIÓN ALTA; Bases de datos = no redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + Traducciones de CDS GenBank + SwissProtein + SPupdate + PIR. Los detalles de estos programas se pueden encontrar en la siguiente dirección de Internet: ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST.

De la manera que se usa en la presente, el término "expresión" se refiere al proceso mediante el cual los polinucleótidos se transcriben en ARNm y/o al proceso mediante el cual el ARNm transcrito se traduce posteriormente en péptidos, polipéptidos o proteínas. Si el polinucleótido se deriva de ADN genómico, la expresión puede incluir el corte y empalme del ARNm en una célula eucariota. El nivel de expresión de un gen se puede determinar midiendo la cantidad de ARNm o proteína en una muestra de célula o tejido. En un aspecto, el nivel de expresión de un gen de una muestra puede compararse directamente con el nivel de expresión de ese gen de una muestra de control o de referencia. En otro aspecto, el nivel de expresión de un gen de una muestra puede compararse directamente con el nivel de expresión de ese gen de la misma muestra después de la administración de un compuesto.

La frase "primera línea", "segunda línea" o "tercera línea" se refiere al orden de tratamiento recibido por un paciente. Los regímenes de terapia de primera línea son

tratamientos que se administran en primer lugar, mientras que la terapia de segunda o tercera línea se administra después de la terapia de primera línea o después de la terapia de segunda línea, respectivamente. El Instituto Nacional del Cáncer define la terapia de primera línea como “el primer tratamiento para una enfermedad o afección”. En pacientes con cáncer, el tratamiento

5 primario puede ser cirugía, quimioterapia, radioterapia o una combinación de estas terapias. La terapia de primera línea también se denomina a los expertos en la técnica como “terapia primaria y tratamiento primario”. Consulte el sitio web del Instituto Nacional del Cáncer en www.cancer.gov, visitado por última vez el 1 de mayo de 2008. Por lo general, a un paciente se le administra un régimen de quimioterapia posterior debido a que el paciente no mostró una

10 respuesta clínica o subclínica positiva a la terapia de primera línea o la terapia de primera línea se detuvo.

De la manera que se usa en la presente, “homología” o “idéntica”, porcentaje de “identidad” o “similitud”, cuando se usa en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o

15 secuencias polipeptídicas, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales, o tienen un porcentaje específico de nucleótidos o residuos de aminoácidos que son iguales, por ejemplo, al menos 60% de identidad, preferiblemente al menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad sobre una región

20 especificada (por ejemplo, secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo descrito en la presente o secuencia de aminoácidos de un anticuerpo descrito en la presente). La homología se puede determinar comparando una posición en cada secuencia que se puede alinear con fines de comparación. Cuando una posición en la secuencia comparada está ocupada por la misma base o aminoácido, entonces las moléculas son homólogas en esa posición. Un grado de homología entre secuencias es una función del número de posiciones coincidentes u

25 homólogas compartidas por las secuencias. La alineación y el porcentaje de homología o identidad de secuencia se pueden determinar utilizando programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos en en Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., Eds. 1987) Suplemento 30, sección 7.7.18, tabla 7.7.1. Preferiblemente, los parámetros predeterminados se usan para la alineación. Un programa de alineación preferido es BLAST, que utiliza parámetros predeterminados. En particular, los programas preferido son BLASTN y

30 BLASTP, utilizando los siguientes parámetros predeterminados: Código genético = estándar; filtro = ninguno; cadena = ambas; corte = 60; esperar = 10; Matriz = BLOSUM62; Descripciones = 50 secuencias; ordenar por = CALIFICACIÓN ALTA; Bases de datos = no redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + Traducciones de CDS GenBank + SwissProtein + SPupdate + PIR. Los detalles de estos programas se pueden encontrar en la siguiente dirección de

35 Internet: ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST. Los términos “homología” o “idéntica”, porcentaje de “identidad” o “similitud” también se refieren o pueden aplicarse al complemento de una secuencia de prueba. Los términos también incluyen secuencias que tienen delecciones y/o

adiciones, así como aquellas que tienen sustituciones. De la manera que se describe en la presente, los algoritmos preferidos pueden tener en cuenta los huecos y similares. Preferiblemente, la identidad existe sobre una región que tiene al menos aproximadamente 25 aminoácidos o nucleótidos de longitud, o más preferiblemente sobre una región que tiene al menos 50-100 aminoácidos o nucleótidos de longitud. Una secuencia “no relacionada” o “no homóloga” comparte menos del 40% de identidad, o alternativamente, menos del 25% de identidad, con una de las secuencias descritas en la presente.

“Hibridación” se refiere a una reacción en la que uno o más polinucleótidos reaccionan para formar un complejo que se estabiliza mediante enlaces de hidrógeno entre las bases de los residuos de nucleótidos. El enlace de hidrógeno puede producirse por el apareamiento de bases Watson Crick, unión de Hoogstein o de cualquier otra manera específica de la secuencia. El complejo puede comprender dos cadenas que forman una estructura bicatenaria, tres o más cadenas que forman un complejo multcatenario, una única cadena autohibridante, o cualquier combinación de las mismas. Una reacción de hibridación puede constituir un paso en un proceso más extenso, tal como el inicio de una reacción de PCR, o la escisión enzimática de un polinucleótido por una ribozima.

Los ejemplos de condiciones de hibridación rigurosas incluyen: temperaturas de incubación de aproximadamente 25°C a aproximadamente 37°C; concentraciones de solución amortiguadora de hibridación de aproximadamente 6x solución salina de citrato de sodio (“SSC”, por sus siglas en inglés) a aproximadamente 10x SSC; concentraciones de formamida de aproximadamente 0% a aproximadamente 25%; y soluciones de lavado de aproximadamente 4x SSC a aproximadamente 8x SSC. Ejemplos de condiciones de hibridación moderadas incluyen: temperaturas de incubación de aproximadamente 40°C a aproximadamente 50°C; concentraciones de solución amortiguadora de aproximadamente 9x SSC a aproximadamente 2x SSC; concentraciones de formamida de aproximadamente 30% a aproximadamente 50%; y soluciones de lavado de aproximadamente 5x SSC a aproximadamente 2x SSC. Ejemplos de condiciones de alta rigurosidad incluyen: temperaturas de incubación de aproximadamente 55°C a aproximadamente 68°C; concentraciones de solución amortiguadora de aproximadamente 1x SSC a aproximadamente 0.1x SSC; concentraciones de formamida de aproximadamente 55% a aproximadamente 75%; y soluciones de lavado de aproximadamente 1x SSC, 0.1x SSC o agua desionizada. En general, los tiempos de incubación de hibridación son de 5 minutos a 24 horas, con 1, 2 o más pasos de lavado, y los tiempos de incubación de lavado son de aproximadamente 1, 2 o 15 minutos. SSC es NaCl 0.15 M y solución amortiguadora de citrato 15 mM. Se entiende que pueden emplearse equivalentes de SSC usando otros sistemas amortiguadores.

De la manera que se usa en la presente, el término “aislado” se refiere a moléculas o materiales biológicos o celulares que están sustancialmente libres de otros materiales. En un

aspecto, el término “aislado” se refiere a un ácido nucleico, tal como ADN o ARN, o proteína o polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo o derivado del mismo), o célula o orgánulo celular, o tejido u órgano, separado de otros ADNs o ARNs, proteínas o polipéptidos, o células u orgánulos celulares, o tejidos u órganos, respectivamente, que están presentes en la fuente natural. El término “aislado” también se refiere a un ácido nucleico o péptido que está sustancialmente libre de material celular, material viral o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas de ADN recombinante, o precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetizan químicamente. Además, se entiende que un “ácido nucleico aislado” incluye fragmentos de ácido nucleico que no se encuentran en la naturaleza como fragmentos y no se encontrarían en el estado natural. El término “aislado” también se usa en la presente para referirse a polipéptidos que se aíslan de otras proteínas celulares y pretende abarcar tanto polipéptidos purificados como recombinantes. El término “aislado” también se usa en la presente para referirse a células o tejidos que se aíslan de otras células o tejidos y pretende abarcar tanto células o tejidos cultivados como modificados genéticamente.

De la manera que se usa en la presente, el término “célula aislada” generalmente se refiere a una célula que está sustancialmente separada de otras células de un tejido.

Las “células inmunes” incluyen, por ejemplo, glóbulos blancos (leucocitos) que se derivan de células madre hematopoyéticas (“HSC”, por sus siglas en inglés) producidas en la médula ósea, linfocitos (células T, células B, células citolíticas naturales (NK)) y células derivadas de mieloides (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos, macrófagos, células dendríticas).

De la manera que se usa en la presente, el término “secuencia de enlazador” se refiere a cualquier secuencia de aminoácidos que comprende de 1 a 10, o alternativamente 8 aminoácidos, o alternativamente 6 aminoácidos, o alternativamente 5 aminoácidos que pueden repetirse de 1 a 10, o alternativamente a aproximadamente 8, o alternativamente a aproximadamente 6, o alternativamente a aproximadamente 5, o 4 o alternativamente 3, o alternativamente 2 veces. Por ejemplo, el enlazador puede comprender hasta 15 residuos de aminoácidos que consisten en un pentapéptido repetido tres veces. En un aspecto, la secuencia de enlazador es un enlazador polipeptídico flexible (Glicina₄Serina)₃ que comprende tres copias de gly-gly-gly-gly-ser.

Una “célula normal correspondiente al tipo de tejido tumoral” se refiere a una célula normal de un mismo tipo de tejido que el tejido tumoral. Un ejemplo no limitativo es una célula pulmonar normal de un paciente que tiene un tumor de pulmón o una célula de colon normal de un paciente que tiene un tumor de colon.

De la manera que se usa en la presente, el término “célula T” se refiere a un tipo de linfocito que madura en el timo. Las células T juegan un papel importante en la inmunidad mediada por células y se distinguen de otros linfocitos, tales como las células B, por la presencia

de un receptor de células T en la superficie celular. Las células T pueden aislarse u obtenerse de una fuente disponible comercialmente. “Célula T” incluye todos los tipos de células inmunes que expresan CD3, incluyendo las células T auxiliares (células CD4+), las células T citotóxicas (células CD8+), las células T citolíticas naturales, las células T reguladoras (Treg) y las células T gamma-delta. Una “célula citotóxica” incluye células T CD8+, células citolíticas naturales (NK) y neutrófilos, células que son capaces de mediar las respuestas de citotoxicidad. Los ejemplos no limitativos de líneas de células T disponibles comercialmente incluyen las líneas BCL2 (AAA) Jurkat (ATCC® CRL-2902™), BCL2 (S70A) Jurkat (ATCC® CRL-2900™), BCL2 (S87A) Jurkat (ATCC® CRL-2901™), BCL2 Jurkat (ATCC® CRL-2899™), Neo Jurkat (ATCC® CRL-2898™),

5 T gamma-delta. Una “célula citotóxica” incluye células T CD8+, células citolíticas naturales (NK) y neutrófilos, células que son capaces de mediar las respuestas de citotoxicidad. Los ejemplos no limitativos de líneas de células T disponibles comercialmente incluyen las líneas BCL2 (AAA) Jurkat (ATCC® CRL-2902™), BCL2 (S70A) Jurkat (ATCC® CRL-2900™), BCL2 (S87A) Jurkat (ATCC® CRL-2901™), BCL2 Jurkat (ATCC® CRL-2899™), Neo Jurkat (ATCC® CRL-2898™),

10 línea de células T humanas citotóxicas TALL-104 (ATCC # CRL-11386). Otros ejemplos incluyen pero no se limitan a líneas de células T maduras, por ejemplo, tales como Deglis, EBT-8, HPB-MLp-W, HUT 78, HUT 102, Karpas 384, Ki 225, My-La, Se-Ax, SKW-3, SMZ-1 y T34; y líneas de células T inmaduras, por ejemplo, ALL-SIL, Be13, CCRF-CEM, CML-T1, DND-41, DU.528, EU-9, HD-Mar, HPB-ALL, H-SB2, HT-1, JK-T1, Jurkat, Karpas 45, KE-37, KOPT-K1,

15 K-T1, L-KAW, Loucy, MAT, MOLT-1, MOLT 3, MOLT-4, MOLT 13, MOLT-16, MT-1, MT-ALL, P12/Ichikawa, Peer, PER0117, PER-255, PF-382, PFI-285, RPMI-8402, ST-4, SUP-T1 to T14, TALL-1, TALL-101, TALL-103/2, TALL-104, TALL-105, TALL-106, TALL-107, TALL-197, TK-6, TLBR-1, -2, -3 y -4, CCRF-HSB-2 (CCL-120.1), J.RT3-T3.5 (ATCC TIB-153), J45.01 (ATCC CRL-1990), J.CaM1.6 (ATCC CRL-2063), RS4;11 (ATCC CRL-1873), CCRF-CEM (ATCC

20 CRM-CCL-119); y líneas de linfoma cutáneo de células T, por ejemplo, HuT78 (ATCC CRM-TIB-161), MJ[G11] (ATCC CRL-8294), HuT102 (ATCC TIB-162). Las líneas celulares de leucemia nula, que incluyen, entre otras, REH, NALL-1, KM-3, L92-221, son otra fuente comercial de células inmunes, al igual que las líneas celulares derivadas de otras leucemias y linfomas, tal como la eritroleucemia K562, leucemia monocítica THP-1, linfoma U937,

25 eritroleucemia HEL, leucemia HL60, leucemia HMC-1, leucemia KG-1, mieloma U266. Las fuentes ejemplares no limitativas para tales líneas celulares disponibles comercialmente incluyen la American Type Culture Collection, o ATCC, (<http://www.atcc.org/>) y la German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (<https://www.dsmz.de/>).

De la manera que se usa en la presente, el término “célula NK”, también conocida como

30 célula citolítica natural, se refiere a un tipo de linfocito que se origina en la médula ósea y juega un papel crítico en el sistema inmune innato. Las células NK proporcionan respuestas inmunes rápidas contra células infectadas por virus, células tumorales u otras células estresadas, incluso en ausencia de anticuerpos y del complejo mayor de histocompatibilidad en las superficies celulares. Las células NK pueden aislarse u obtenerse de una fuente comercialmente

35 disponible. Los ejemplos no limitativos de líneas celulares NK comerciales incluyen las líneas NK-92 (ATCC® CRL-2407™), NK-92MI (ATCC® CRL-2408™). Otros ejemplos incluyen, pero no se limitan a, las líneas NK HANK1, KHYG-1, NKL, NK-YS, NOI-90 e YT. Las fuentes

ejemplares no limitativas para tales líneas celulares disponibles comercialmente incluyen la American Type Culture Collection, o ATCC, (<http://www.atcc.org/>) y la German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (<https://www.dsmz.de/>).

De la manera que se usa en la presente en referencia a un polinucleótido regulador, el término “ligado operativamente” se refiere a una asociación entre el polinucleótido regulador y la secuencia de polinucleótido a la que está enlazado de tal manera que, cuando una proteína específica se une al polinucleótido regulador, el polinucleótido enlazado se transcribe.

De la manera que se usa en la presente, el término “sobreexpresar” con respecto a una célula, un tejido o un órgano expresa una proteína en una cantidad que es mayor que la cantidad que se produce en una célula de control, un tejido de control o un órgano. Una proteína que se sobreexpresa puede ser endógena a la célula huésped o exógena a la célula huésped.

Los términos “polinucleótido” y “oligonucleótido” se usan indistintamente y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o análogos de los mismos. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional y pueden realizar cualquier función, conocida o desconocida. Los siguientes son ejemplos no limitativos de polinucleótidos: un gen o fragmento de gen (por ejemplo, una sonda, cebador, etiqueta de análisis en serie de expresión génica (“SAGE”, por sus siglas en inglés) o etiqueta de secuencia expresada (“EST”, por sus siglas en inglés)), exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ARNi, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico y cebadores. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos. Si están presentes, pueden impartirse modificaciones a la estructura de nucleótidos antes o después del ensamblaje del polinucleótido. La secuencia de nucleótidos puede ser interrumpida por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente después de la polimerización, tal como mediante la conjugación con un componente de etiquetado. El término también se refiere a moléculas monocatenarias y bicatenarias. A menos que se especifique o requiera lo contrario, cualquier aspecto de esta tecnología que sea un polinucleótido abarca tanto la forma bicatenaria como cada una de las dos formas complementarias monocatenarias conocidas o previstas para formar la forma bicatenaria.

De la manera que se usa en la presente, los términos “secuencia de ácido nucleico” y “polinucleótido” se usan indistintamente para referirse a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. Por lo tanto, este término incluye, pero no se limita a, ADN o ARN monocatenario, bicatenario o multcatenario, ADN genómico, ADNc, híbridos de ADN-ARN o un polímero que comprende bases de purina y

pirimidina u otras bases de nucleótidos naturales, modificadas química o bioquímicamente, no naturales o derivatizadas.

De la manera que se usa en la presente, el término “promotor” se refiere a cualquier secuencia que regule la expresión de una secuencia de codificación, tal como un gen. Los promotores pueden ser constitutivos, inducibles, reprimibles o específicos de tejido, por ejemplo. Un “promotor” es una secuencia de control que es una región de una secuencia de polinucleótidos en la que se controlan el inicio y la velocidad de transcripción. Puede contener elementos genéticos a los que se pueden unir proteínas y moléculas reguladoras, tales como la ARN polimerasa y otros factores de transcripción. Los ejemplos no limitativo de promotores incluyen el promotor de EF1 alfa y el promotor de CMV. La secuencia de EF1alfa es conocida en la técnica (ver, por ejemplo, addgene.org/11154/sequences/; ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/J04617, cada uno de los cuales se consultó por última vez el 13 de marzo de 2019, y Zheng & Baum (2014) *Int'l. J. Med. Sci.* 11(5):404-408). La secuencia del promotor de CMV se conoce en la técnica (ver, por ejemplo, snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=basic_cloning_vectors&plasmid=CMV_promoter, consultado por última vez el 13 de marzo de 2019, y Zheng & Baum (2014), *ut supra*).

Los términos “proteína”, “péptido” y “polipéptido” se usan indistintamente y en su sentido más amplio para referirse a un compuesto de dos o más subunidades de aminoácidos, análogos de aminoácidos o peptidomiméticos. Las subunidades pueden estar unidas por enlaces peptídicos. En otro aspecto, la subunidad puede estar unida por otros enlaces, por ejemplo, éster, éter, etc. Una proteína o péptido debe contener al menos dos aminoácidos y no se impone ninguna limitación al número máximo de aminoácidos que pueden comprender una secuencia de proteína o de péptido. De la manera que se usa en la presente, el término “aminoácido” se refiere a aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos, que incluyen glicina y los isómeros ópticos D y L, análogos de aminoácidos y peptidomiméticos.

De la manera que se usa en la presente, el término “purificado” no requiere pureza absoluta; más bien, está pensado como un término relativo. Así, por ejemplo, un ácido nucleico, péptido, proteína, complejos biológicos u otro compuesto activo purificado es uno que está aislado en su totalidad o en parte de proteínas u otros contaminantes. Generalmente, los péptidos, proteínas, complejos biológicos u otros compuestos activos sustancialmente purificados para su uso en la descripción comprenden más del 80% de todas las especies macromoleculares presentes en una preparación antes de la mezcla o formulación del péptido, proteína, complejo biológico u otro compuesto activo con un portador, excipiente, solución amortiguadora, agente potenciador de la absorción, estabilizador, conservador, adyuvante u otro co-ingrediente farmacéutico en una formulación farmacéutica completa para administración terapéutica. Más típicamente, el péptido, proteína, complejo biológico u otro compuesto activo se purifica para representar más del 90%, a menudo más del 95% de todas las especies

macromoleculares presentes en una preparación purificada antes de la mezcla con otros ingredientes de la formulación. En otros casos, la preparación purificada puede ser esencialmente homogénea, en donde otras especies macromoleculares no son detectables mediante técnicas convencionales.

- 5 De la manera que se usa en la presente, el término “marcador de purificación” se refiere al menos a un marcador útil para purificación o identificación. Una lista no exhaustiva de este marcador incluye His, lacZ, GST, proteína de unión a maltosa, NusA, proteína portadora de biotina-carboxilo (“BCCP”, por sus siglas en inglés), c-myc, calmodulina (CaM), FLAG, GFP, proteína fluorescente amarilla (“YFP”, por sus siglas en inglés), tipo Cherry, tioredoxina,
- 10 poli(fosfatasa del ácido N-acetilneuramínico (“NANP”, por sus siglas en inglés)), V5, Snap, hemaglutinina (HA), proteína de unión a quitina, Softag 1, Softag 3, Strep o proteína S. Los marcadores de fluorescencia directa o indirecta adecuados comprenden FLAG, GFP, YFP, proteína fluorescente roja (“RFP”, por sus siglas en inglés), dTomato, tipo Cherry, Cy3, Cy 5, Cy 5.5, Cy 7, dinitrofenilo (“DNP”, por sus siglas en inglés), carbohidrato de manobiosido (“AMCA”,
- 15 por sus siglas en inglés), biotina, digoxigenina, Tamra, rojo Texas, rodamina, Alexa flúor, FITC, isotiocianato de tetrametilrodamina (“TRITC”, por sus siglas en inglés) o cualquier otro colorante fluorescente o hapteno.

- De la manera que se usa en la presente, el término “proteína recombinante” se refiere a un polipéptido que se produce mediante técnicas de ADN recombinante, en donde
- 20 generalmente, el ADN que codifica el polipéptido se inserta en un vector de expresión adecuado que a su vez se usa para transformar una célula huésped para producir la proteína heteróloga.

- De la manera que se usa en la presente, el término “unión específica” significa el contacto entre un anticuerpo y un antígeno con una afinidad de unión de al menos 10^{-6} M. En ciertos aspectos, los anticuerpos se unen con afinidades de al menos aproximadamente 10^{-7} M,
- 25 y preferiblemente 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, o 10^{-12} M.

Un “tumor sólido” es una masa anormal de tejido que generalmente no contiene quistes ni áreas líquidas. Los tumores sólidos pueden ser benignos o malignos, metastásicos o no metastásicos. Los diferentes tipos de tumores sólidos reciben el nombre del tipo de células que los forman. Los ejemplos de tumores sólidos incluyen sarcomas, carcinomas y linfomas.

- 30 De la manera que se usa en la presente, el término “gen suicida” es un gen capaz de inducir la apoptosis celular; los ejemplos no limitativos incluyen la timidina quinasa del virus del herpes simplex (“HSV-TK”, por sus siglas en inglés), citosina desaminasa, nitroreductasa, carboxilesterasa, citocromo P450 o purina nucleósido fosforilasa (“PNP”, por sus siglas en inglés), receptor del factor de crecimiento epidérmico (“EGFR”, por sus siglas en inglés)
- 35 truncado o caspasa inducible (“iCasp”, por sus siglas en inglés). Los genes suicidas pueden funcionar a lo largo de diversas vías y, en algunos casos, pueden ser inducibles por un agente inductor, tal como una molécula pequeña. Por ejemplo, el gen suicida iCasp comprende una

porción de una proteína caspasa unida operativamente a una proteína optimizada para unirse a un agente inductor; la introducción del agente inductor en una célula que comprende el gen suicida da como resultado la activación de la caspasa y la posterior apoptosis de dicha célula.

5 El término “transducción” o “transducción”, tal como se aplica a la producción de células receptoras de antígenos quiméricos, se refiere al proceso mediante el cual se introduce una secuencia de nucleótidos extraña en una célula. En algunas modalidades, esta transducción se realiza mediante un vector.

De la manera que se usa en la presente, “tratar” o “tratamiento” de una enfermedad en un sujeto se refiere a (1) evitar que los síntomas o la enfermedad ocurran en un sujeto que está
10 predispuesto o que aún no presenta síntomas de la enfermedad; (2) inhibir la enfermedad o detener su desarrollo; o (3) mejorar o provocar la regresión de la enfermedad o los síntomas de la enfermedad. Como se entiende en la técnica, “tratamiento” es un método para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluyendo los resultados clínicos. Para los propósitos de la presente tecnología, los resultados beneficiosos o deseados pueden incluir uno o más de,
15 pero no se limitan a, los siguientes: alivio o mejora de uno o más síntomas, disminución del alcance de una condición (incluyendo una enfermedad), estado estabilizado (es decir, sin empeoramiento) de una condición (incluyendo la enfermedad), retraso o desaceleración de la afección (incluyendo la enfermedad), progresión, mejora o paliación de la afección (incluyendo la enfermedad), estados y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable.
20 Los tratamientos que contienen las composiciones y métodos descritos pueden ser terapias de primera línea, segunda línea, tercera línea, cuarta línea, quinta línea y están previstos para usarse como terapia única o en combinación con otras terapias apropiadas. En un aspecto, el término “tratamiento” o “tratar” excluye la prevención o la profilaxis.

De la manera que se usa en la presente, el término “vector” se refiere a una construcción
25 de ácido nucleico diseñada para la transferencia entre diferentes huéspedes, que incluyen, entre otros, un plásmido, un virus, un cósmido, un fago, un cromosoma artificial bacteriano (“BAC”, por sus siglas en inglés), un cromosoma artificial de levaduras (“YAC”, por sus siglas en inglés), etc. En algunas modalidades, los vectores plasmídicos se pueden preparar a partir de vectores disponibles comercialmente. En otras modalidades, los vectores virales se pueden producir a
30 partir de baculovirus, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados (“AAVs”, por sus siglas en inglés), etc. de acuerdo con técnicas conocidas en el arte. En una modalidad, el vector viral es un vector lentiviral.

De la manera que se usa en la presente, el término “NKG2D” se refiere a una proteína transmembrana que pertenece a la familia CD94/NKG2 de receptores tipo lectina de tipo C y
35 codificada por el gen KLRK1, que se encuentra en el complejo del gen NK y/o equivalente del mismo. Las secuencias ejemplares no limitativas de esta proteína o el gen subyacente se pueden encontrar en Gene Cards ID: GC12M011728, HGNC: 18788, Entrez Gene: 22914,

Ensembl: ENSG00000213809, OMIM: 611817, y UniProtKB: P26718, que se incorporan en la presente a modo de referencia.

De la manera que se usa en la presente, los términos “BCMA” y “antígeno de maduración de células B” se usan indistintamente para referirse a una proteína que pertenece a la superfamilia de TNF que reconoce el factor de activación de células B (“BAFF”, por sus siglas en inglés) y codificada por el gen *TNFRSF17*. Las secuencias ejemplares no limitativas de esta proteína o el gen subyacente se pueden encontrar en Gene Cards ID: GC16P012058, HGNC: 11913, Entrez Gene: 608, Ensembl: ENSG00000048462, OMIM: 109545, y UniProtKB: Q02223, que se incorporan en la presente a modo de referencia.

De la manera que se usa en la presente los términos “SLAMF7”, “CS1”, y “CD319” se utilizan indistintamente para referirse a una proteína conocida por ser un marcador robusto de células plasmáticas normales y células plasmáticas malignas en el mieloma múltiple y codificada por el gen *SLAMF7*. Las secuencias ejemplares no limitativas de esta proteína o el gen subyacente se pueden encontrar en Gene Cards ID: GC01P160709, HGNC: 21394, Entrez Gene: 57823, Ensembl: ENSG00000026751, OMIM: 606625, y UniProtKB: Q9NQ25, que se incorporan en la presente a modo de referencia.

Las secuencias asociadas con cada uno de los números de acceso y referencias de GenBank enumerados anteriormente se incorporan en la presente a modo de referencia.

MODOS PARA LLEVAR A CABO LA DESCRIPCIÓN

Se ha perseguido la administración de moléculas inmunorreguladoras como terapéutica contra el cáncer. Sin embargo, debido a los efectos secundarios graves asociados con la administración sistémica (Giovarelli, M. et al. (2000) J Immunol. 164:3200-3206; Lasek, W. et al. (2014) Cancer Immunol Immunother. 63:419-435), ha sido difícil obtener altas concentraciones de estas moléculas inmunorreguladoras en tumores relevantes para lograr una respuesta inmune efectiva.

Debido a los resultados sin precedentes que se han obtenido recientemente en linfomas de células B y leucemias utilizando un tratamiento autólogo con células T con receptor de antígeno quimérico (CAR) modificadas genéticamente (Maude, SL et al. (2014) New Engl. J. Med. 371:1507-1517; Porter, D.L. et al. (2011) New Engl. J. Med. 365:725-733), varios laboratorios han comenzado a aplicar este método a tumores sólidos, incluyendo el cáncer de ovario, el cáncer de próstata y los tumores pancreáticos. Las células T modificadas con CAR combinan la especificidad de direccionamiento independiente de HLA de un anticuerpo monoclonal con la actividad citolítica, la proliferación y las propiedades de localización de las células T activadas, pero no responden a la supresión del punto de control. Debido a su capacidad para destruir objetivos que expresan antígenos directamente, las células T con CAR son altamente tóxicas para cualquier tejido o célula con antígeno positivo, por lo que es un requisito construir CARs con anticuerpos altamente específicos del tumor. Hasta la fecha, se

han construido células T modificadas con CAR para tumores sólidos humanos contra el receptor de α -folato, mesotelina y MUC-CD, antígeno de membrana específico de próstata ("PSMA", por sus siglas en inglés) y otros objetivos, pero la mayoría tiene alguna expresión de antígeno fuera de objetivo en tejidos normales. Estas construcciones no han mostrado los mismos resultados excepcionales en pacientes que enfatizan la necesidad de estudios adicionales para identificar nuevos objetivos y métodos de construcción de células T con CAR que puedan usarse contra tumores sólidos.

Por lo tanto, esta descripción proporciona un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión específico para un antígeno tumoral o canceroso, que en algunos aspectos, es el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-BCMA, un vector que codifica una célula BsA-CAR que se dirige a un antígeno tumoral o canceroso y secreta fragmentos de anticuerpos solubles, así como métodos y composiciones relacionados con el uso y producción de los mismos.

Receptores de antígenos quiméricos y usos de los mismos

Componentes

La presente descripción proporciona receptores de antígenos quiméricos (CARs) que se unen a un antígeno canceroso o tumoral, en donde el CAR comprende, o consiste esencialmente en, o consiste en, un resto de activación celular que comprende un dominio extracelular, transmembrana e intracelular. El dominio extracelular comprende un elemento de unión específico de la objetivo, también denominado dominio de unión al antígeno. El dominio intracelular o dominio citoplásmico comprende una región de señalización coestimuladora y una porción de cadena zeta. El CAR puede comprender además opcionalmente un dominio espaciador de hasta 300 aminoácidos, preferiblemente de 10 a 100 aminoácidos, más preferiblemente de 25 a 50 aminoácidos.

Dominio espaciador. El CAR puede comprender además opcionalmente un dominio espaciador de hasta 300 aminoácidos, preferiblemente de 10 a 100 aminoácidos, más preferiblemente de 25 a 50 aminoácidos. Por ejemplo, el espaciador puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 aminoácidos. Un dominio espaciador puede comprender, por ejemplo, una parte de un dominio Fc humano, un dominio constante de cadena pesada 3 ("CH3", por sus siglas en inglés) o la región de bisagra de cualquier inmunoglobulina, tal como IgA, IgD, IgE, IgG o IgM, o variantes de los mismos. Por ejemplo, algunas modalidades pueden comprender una bisagra de IgG4 con o sin una mutación S228P, L235E y/o N297Q (según la numeración de Kabat). Los espaciadores adicionales incluyen, pero no se limitan a, regiones de bisagra de CD4, CD8 y CD28.

Dominio de unión a antígeno. En ciertos aspectos, la presente descripción proporciona un CAR que comprende, o alternativamente consiste esencialmente en el mismo, o además

consiste en un dominio de unión a antígeno específico para un antígeno canceroso o tumoral. Los dominios de unión al antígeno pueden ser de cualquier especie apropiada, por ejemplo, murina, humana o una secuencia humanizada.

En algunas modalidades, el dominio de unión a antígeno comprende, o alternativamente
 5 consiste esencialmente en el mismo, o aún consiste en el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo anti-BCMA o un anticuerpo que se une a un antígeno relevante para BCMA. Los anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a estos antígenos están disponibles comercialmente. Los dominios de unión al antígeno pueden ser de cualquier especie apropiada, por ejemplo, murina, humana o una secuencia humanizada. En un aspecto, el dominio de unión
 10 al antígeno comprende la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera de un anticuerpo contra el antígeno de maduración de células B (BCMA) y/o SLAMF7 (también conocido como CS1 o CD319), y/o un equivalente de cada uno de ellos. En algunas modalidades, el dominio de unión al antígeno comprende, consiste en, o consiste esencialmente en un fragmento del anticuerpo específico del objetivo (es decir, un anticuerpo contra el antígeno
 15 de maduración de células B (BCMA) y/o SLAMF7 (también conocido como CS1 o CD319) y/o un equivalente de cada uno de ellos), por ejemplo, un scFv. Una región scFv puede comprender las regiones variables de las cadenas pesada (V_H) y ligera (V_L) de inmunoglobulinas, conectadas con un péptido enlazador corto. El péptido enlazador puede ser de 1 a 50 aminoácidos, por ejemplo, 11, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25,
 20 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador es rico en glicina, aunque también puede contener serina o treonina.

En otro aspecto de la presente descripción, el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo contra el cáncer o un tumor incluye una o más de las siguientes características:

25 (a) la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera comprende una o más CDRs que son al menos un 80% idénticas a una CDR de un dominio variable de cadena ligera de cualquiera de las secuencias de cadena ligera descritas;

(b) la secuencia del dominio variable de la inmunoglobulina de cadena pesada comprende una o más CDRs que son al menos 80% idénticas a una CDR de un dominio variable
 30 de cadena pesada de cualquiera de las secuencias de cadena pesada descritas;

(c) la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera es al menos un 80% idéntica a un dominio variable de cadena ligera de cualquiera de las secuencias de cadena ligera descritas;

(d) la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina HC es al menos un 80%
 35 idéntica a un dominio variable de cadena pesada de cualquiera de las secuencias de cadena ligera descritas; y

(e) el anticuerpo se une a un epítipo que se solapa con un epítipo unido por cualquiera de las secuencias descritas.

Ejemplos adicionales de equivalentes incluyen péptido que tiene al menos 85%, o alternativamente al menos 90%, o alternativamente al menos 95%, o alternativamente al menos 97% de identidad de aminoácidos con el péptido o un polipéptido que está codificado por un polinucleótido que se hibrida bajo condiciones de alta rigurosidad para el complemento de un polinucleótido que codifica el dominio de unión al antígeno, en donde las condiciones de alta rigurosidad comprenden temperaturas de incubación de aproximadamente 55°C a aproximadamente 68°C; concentraciones de solución amortiguadora de aproximadamente 1x SSC a aproximadamente 0.1x SSC; concentraciones de formamida de aproximadamente 55% a aproximadamente 75%; y soluciones de lavado de aproximadamente 1x SSC, 0.1x SSC o agua desionizada.

Dominio transmembrana. El dominio transmembrana puede derivarse de una fuente natural o sintética. Cuando la fuente es natural, el dominio puede derivar de cualquier proteína transmembrana o unida a membrana. Las regiones transmembrana de uso particular en esta descripción pueden derivarse de CD8, CD28, CD3, CD45, CD4, CD5, CDS, CD9, CD 16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD 154, TCR. Alternativamente, el dominio transmembrana puede ser sintético, en cuyo caso comprenderá residuos predominantemente hidrófobos, tales como leucina y valina. Preferiblemente, se encontrará un triplete de fenilalanina, triptófano y valina en cada extremo de un dominio transmembrana sintético. Opcionalmente, un enlazador oligo- o polipéptido corto, preferiblemente de entre 2 y 10 aminoácidos de longitud, puede formar el enlace entre el dominio transmembrana y el dominio de señalización citoplásmico del CAR. Un doblete de glicina-serina proporciona un enlazador particularmente adecuado.

Dominio citoplasmático. El dominio citoplasmático o dominio de señalización intracelular del CAR es responsable de la activación de al menos una de las funciones efectoras tradicionales de una célula inmune en la que se ha colocado un CAR. El dominio de señalización intracelular se refiere a una porción de una proteína que transduce la señal de la función efectora y dirige a la célula inmune para que realice su función específica. Se puede usar un dominio de señalización completo o una parte truncada del mismo siempre que la parte truncada sea suficiente para transducir la señal de la función efectora. Las secuencias citoplásmicas del TCR y los correceptores, así como los derivados o variantes de los mismos, pueden funcionar como dominios de señalización intracelular para su uso en un CAR. Los dominios de señalización intracelular de uso particular en esta descripción pueden derivarse de receptores de Fe ("FcR", por sus siglas en inglés), TCR, CD3, CDS, CD22, CD79a, CD79b, CD66d. En algunas modalidades, el dominio de señalización del CAR puede comprender un dominio de señalización de CD3 ζ.

Dado que las señales generadas a través del TCR son por sí solas insuficientes para la activación completa de una célula T, también puede ser necesaria una señal secundaria o coestimuladora. Por lo tanto, la región intracelular de una molécula de señalización coestimuladora, que incluye, entre otros, los dominios intracelulares de las proteínas CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno 1 asociado a la función de los linfocitos ("LFA-1", por sus siglas en inglés), CD2, CD7, miembro 14 de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNFSF14, también conocido como LIGHT), NKG2C, homólogo de B7 3 (B7-H3), o un ligando que se une específicamente con CD83, también pueden incluirse en el dominio citoplásmico del CAR. Por ejemplo, un CAR puede comprender uno, dos o más dominios coestimuladores, además de un dominio de señalización (por ejemplo, un dominio de señalización de CD3 ζ).

En algunas modalidades, el resto de activación celular del receptor de antígeno quimérico es un dominio de señalización de células T que comprende, o alternativamente consiste esencialmente en, o además consiste en, una o más proteínas o fragmentos de las mismas seleccionados del grupo que consiste en proteína CD8, proteína CD28, proteína 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, CD27, LIGHT, NKG2C, B7-H3 y proteína CD3-zeta.

En algunas modalidades, el resto de activación celular del receptor de antígeno quimérico es un dominio de señalización de células T que comprende, o alternativamente consiste esencialmente en, o además consiste en, una o más proteínas o fragmentos de las mismas seleccionados del grupo que consiste en proteína CD8, proteína CD28, proteína 4-1BB y proteína CD3-zeta.

En modalidades específicas, el CAR comprende, o alternativamente consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo dirigido a un cáncer o tumor, un dominio de bisagra CD8 α , un dominio transmembrana de CD8 α , una región de señalización coestimuladora y un dominio de señalización de CD3 zeta. En modalidades adicionales, la región de señalización coestimuladora comprende una o ambas, una región de señalización coestimuladora de CD28 y una región de señalización coestimuladora de 4-1BB.

En algunas modalidades, el CAR puede comprender además un marcador detectable o un marcador de purificación. En otro aspecto, los CARs como se describen en la presente están contenidos en una composición, por ejemplo, un portador farmacéuticamente aceptable para diagnóstico o terapia.

Mecanismos de conmutación. En algunas modalidades, el CAR también puede comprender un mecanismo de conmutación para controlar la expresión y/o activación del CAR. Por ejemplo, un CAR puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en un dominio extracelular, transmembrana e intracelular, en donde el dominio extracelular comprende un

elemento de unión específico del objetivo que se une a una etiqueta, dominio de unión o etiqueta que es específica para un molécula distinta del antígeno objetivo que se expresa en o es expresado por una célula objetivo. En tales modalidades, la especificidad del CAR es proporcionada por una segunda construcción que comprende, consiste en, o consiste esencialmente en un dominio de unión al antígeno objetivo y un dominio que es reconocido por o se une al marcador, dominio de unión o etiqueta en el CAR. Ver, por ejemplo, WO 2013/044225, WO 2016/000304, WO 2015/057834, WO 2015/057852, WO 2016/070061, US 9,233,125, US 2016/0129109. De esta manera, una célula T que expresa el CAR puede administrarse a un sujeto, pero no puede unirse a su antígeno objetivo (es decir, BCMA) hasta que se administre la segunda composición que comprende un dominio de unión específico de BCMA.

Los CARs de la presente descripción también pueden requerir multimerización para activar su función (ver, por ejemplo, US 2015/0368342, US 2016/0175359, US 2015/0368360) y/o una señal exógena, tal como un fármaco de molécula pequeña (US 2016/0166613, Yung et al., Science, 2015) con el fin de provocar una respuesta de células T.

Además, los CARs descritos pueden comprender un “interruptor suicida” (también denominado “gen suicida”) para inducir la muerte celular de las células CAR después del tratamiento (Buddee et al., PLoS One, 2013) o para regular a la baja la expresión del CAR tras la unión al antígeno objetivo (WO 2016/011210). Un interruptor suicida o gen suicida ejemplar no limitativo es iCasp.

En algunas modalidades, el CAR puede comprender además un marcador detectable o un marcador de purificación. En otro aspecto, los CARs como se describen en la presente están contenidos en una composición, por ejemplo, un portador farmacéuticamente aceptable para diagnóstico o terapia.

En determinadas modalidades, el dominio de unión al antígeno del anticuerpo dirigido al tumor del CAR comprende, o alternativamente consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que están opcionalmente unidas por un péptido enlazador. En algunas modalidades, la región variable de cadena pesada y/o ligera comprende, o alternativamente consiste esencialmente en las mismas, o además consiste en las regiones CDR relevantes de un anticuerpo para cualquiera de los antígenos de maduración de células B (BCMA) y/o SLAMF7 (también conocido como CS1 o CD319), y/o un equivalente de cada uno de ellos. En un aspecto, el anticuerpo dirigido al tumor se dirige a BCMA. En ciertas modalidades, el CAR comprende además, o alternativamente consiste además esencialmente en, o además consiste en, un polipéptido enlazador ubicado entre la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera. En determinadas modalidades, el enlazador es un enlazador de glicina-serina. En modalidades adicionales, el polipéptido enlazador comprende, o alternativamente consiste

esencialmente en el mismo, o además consiste en la secuencia (glicina-serina)_n en donde n es un número entero de 1 a 6.

También se proporcionan ácidos nucleicos aislados que codifican las construcciones de CAR. Los ácidos nucleicos pueden comprender además las secuencias reguladoras necesarias, por ejemplo, un promotor para la expresión en una célula huésped, por ejemplo, una célula huésped de mamífero o humana, tal como una célula T. En un aspecto, el promotor es un promotor CMV, potenciador del virus del sarcoma mieloproliferativo, región de control negativo eliminada, sitio de unión del cebador dl587rev sustituido ("MND", por sus siglas en inglés) o EF1 alfa. En un aspecto adicional, el polinucleótido de CAR comprende además un péptido marcador (por ejemplo, GFP) que puede regularse a partir de un segundo elemento promotor, por ejemplo, promotores de CMV, MND y EF1A, situados en 5' respecto al polinucleótido de codificación. En un aspecto, el segundo promotor comprende un promotor de EF1 alfa. Como es evidente para el experto en la materia, el promotor o promotores se seleccionan para el sistema de expresión del huésped y variarán con el huésped y el vector de expresión y el uso pretendido.

El ácido nucleico aislado se puede insertar en un vector de expresión, por ejemplo, un vector lentiviral o retroviral (entre las LTRs 5' y 3') o un vector de adenovirus o cualquier otro vector que pueda expresar un gen. La Figura 1A es una construcción ejemplar de esta descripción. Como es evidente, cuando se usa clínicamente en un paciente humano, los marcadores o etiquetas de purificación se omitirán de la construcción.

Proceso de preparación de anticuerpos

Los anticuerpos para usar en esta descripción se pueden comprar o preparar usando métodos conocidos en la técnica y descritos brevemente en la presente. Si se descubre un nuevo antígeno, será necesario fabricar anticuerpos y dominios de unión a antígeno de los anticuerpos. Su fabricación y usos son bien conocidos y se describen, por ejemplo, en Harlow, E. & Lane, D., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999. Los anticuerpos se pueden generar usando métodos estándar conocidos en la técnica. Los ejemplos de anticuerpos incluyen (pero no se limitan a) fragmentos de anticuerpos monoclonales, monocatenarios y funcionales.

Los anticuerpos pueden producirse en diversos huéspedes, por ejemplo, cabras, conejos, ratas, ratones, humanos y otros. Pueden inmunizarse mediante inyección con un antígeno objetivo o un fragmento u oligopéptido del mismo que tenga propiedades inmunogénicas, tal como un fragmento C-terminal, un antígeno relevante para cáncer o tumor, o un polipéptido aislado, tal como BCMA o NKG2D. Dependiendo de la especie huésped, se pueden añadir y usar varios adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica. Dichos adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, adyuvantes de Freund, geles minerales tales como hidróxido de aluminio y sustancias tensioactivas, tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianina de la lapa californiana y dinitrofenol.

Entre los adyuvantes usados en humanos, BCG (Bacille Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum* son particularmente útiles. Esta descripción también proporciona el polipéptido aislado y un adyuvante.

En ciertos aspectos, los anticuerpos de la presente descripción son policlonales, es decir, una mezcla de varios tipos de anticuerpos que tienen diferentes secuencias de aminoácidos. En un aspecto, el anticuerpo policlonal comprende una mezcla de varios tipos de anticuerpos que tienen diferentes CDRs. Como tal, se cultiva una mezcla de células que producen diferentes anticuerpos y se puede usar un anticuerpo purificado del cultivo resultante (ver WO 2004/061104).

- 10 *Producción de anticuerpos monoclonales.* Los anticuerpos monoclonales contra un cáncer o un antígeno tumoral pueden prepararse usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpos mediante líneas celulares continuas en cultivo. Tales técnicas incluyen, pero no se limitan a, la técnica del hibridoma (ver, por ejemplo, Kohler & Milstein, *Nature* 256: 495-497 (1975)); la técnica del trioma; la técnica del hibridoma de células
- 15 B humanas (véase, por ejemplo, Kozbor et al., *Immunol. Today* 4: 72 (1983)) y la técnica de hibridoma de virus de Epstein-Barr (VEB) para producir anticuerpos monoclonales humanos (ver, por ejemplo, Cole et al., en: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985)). Pueden utilizarse anticuerpos monoclonales humanos en la práctica de la presente tecnología y pueden producirse utilizando hibridomas humanos (ver, por
- 20 ejemplo, Cote et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 2026-2030 (1983)) o transformando células B humanas con el virus de Epstein Barr *in vitro* (ver, por ejemplo, Cole et al., en: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985)). Por ejemplo, se puede aislar una población de ácidos nucleicos que codifican regiones de anticuerpos. La reacción en cadena de la polimerasa ("PCR", por sus siglas en inglés) que utiliza cebadores
- 25 derivados de secuencias que codifican regiones conservadas de anticuerpos se utiliza para amplificar secuencias que codifican porciones de anticuerpos de la población y posteriormente reconstruir ADN que codifica anticuerpos o fragmentos de los mismos, tales como dominios variables, a partir de las secuencias amplificadas. Dichas secuencias amplificadas también pueden fusionarse con ADN que codifican otras proteínas, por ejemplo, una cubierta de
- 30 bacteriófago o una proteína de superficie celular bacteriana, para la expresión y presentación de los polipéptidos de fusión en fagos o bacterias. A continuación, las secuencias amplificadas se pueden expresar y seleccionar o aislar adicionalmente basándose, por ejemplo, en la afinidad del anticuerpo expresado o fragmento del mismo por un antígeno o epítipo presente en el polipéptido antigénico relevante de BCMA. Alternativamente, los hibridomas que expresan
- 35 anticuerpos monoclonales se pueden preparar inmunizando a un sujeto, por ejemplo, con un polipéptido aislado que comprende, o alternatively consiste esencialmente en, o además consiste en, la secuencia de aminoácidos del antígeno relevante o un fragmento del mismo, y

posteriormente aislando hibridomas del bazo del sujeto usando métodos de rutina. Ver, por ejemplo, Milstein et al., (Galfre & Milstein, *Methods Enzymol* 73: 3-46 (1981)). El cribado de los hibridomas usando métodos estándar producirá anticuerpos monoclonales de especificidad (es decir, para diferentes epítomos) y afinidad variables. Un anticuerpo monoclonal seleccionado con las propiedades deseadas, por ejemplo, una unión de antígeno relevante, puede (i) usarse como lo expresa el hibridoma, (ii) unirse a una molécula como polietilenglicol (PEG) para alterar sus propiedades, o (iii) se puede aislar, secuenciar y manipular un ADNc que codifica el anticuerpo monoclonal de diversas formas. En un aspecto, el anticuerpo monoclonal es producido por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera fusionado a una célula inmortalizada. Las técnicas de hibridoma incluyen las conocidas en la técnica y enseñadas en Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 349 (1988); Hammerling et al., *Monoclonal Antibodies And T-Cell Hybridomas*, 563-681 (1981).

Técnica de expresión en fagos. Como se indicó anteriormente, los anticuerpos de la presente descripción se pueden producir mediante la aplicación de ADN recombinante y tecnología de expresión en fagos. Por ejemplo, los anticuerpos de BCMA se pueden preparar usando varios métodos de expresión en fagos conocidos en la técnica. En los métodos de expresión en fagos, los dominios de anticuerpos funcionales se muestran en la superficie de una partícula de fago que lleva secuencias de polinucleótidos que los codifican. El fago con una propiedad de unión deseada se selecciona de un repertorio o biblioteca combinatoria de anticuerpos (por ejemplo, humanos o murinos) al seleccionar directamente un antígeno, típicamente un antígeno unido o capturado a una superficie sólida o perla. Los fagos usados en estos métodos son típicamente fagos filamentosos que incluyen fd y M13 con dominios de anticuerpo Fab, Fv o Fv estabilizados con disulfuro que se fusionan de manera recombinante con la proteína del gen III o del gen VIII del fago. Además, los métodos se pueden adaptar para la construcción de bibliotecas de expresión de Fab (ver, por ejemplo, Huse et al., *Science* 246: 1275-1281, 1989) para permitir la identificación rápida y eficaz de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada por un polipéptido antigénico relevante, por ejemplo, un polipéptido o derivados, fragmentos, análogos u homólogos del mismo. Otros ejemplos de métodos de expresión en fagos que se pueden usar para preparar los anticuerpos aislados de la presente descripción incluyen los descritos en Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85: 5879-5883 (1988); Chaudhary et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87: 1066-1070 (1990); Brinkman et al., *J. Immunol. Methods* 182: 41-50 (1995); Ames et al., *J. Immunol. Methods* 184: 177-186 (1995); Kettleborough et al., *Eur. J. Immunol.* 24: 952-958 (1994); Persic et al., *Gene* 187: 9-18 (1997); Burton et al., *Advances in Immunology* 57: 191-280 (1994); PCT/GB91/01134; WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; WO

96/06213; WO 92/01047 (Medical Research Council *et al.*); WO 97/08320 (Morphosys); WO 92/01047 (CAT/MRC); WO 91/17271 (Affymax); y las patentes de EE.UU. No. 5,698,426, 5,223,409, 5,403,484, 5,580,717, 5,427,908, 5,750,753, 5,821,047, 5,571,698, 5,427,908, 5,516,637, 5,780,225, 5,658,727 y 5,733,743.

- 5 Los métodos útiles para presentar polipéptidos en la superficie de partículas de bacteriófago uniendo los polipéptidos mediante enlaces disulfuro han sido descritos por Lohning, Patente de EE.UU. No.6,753,136. Como se describe en las referencias anteriores, después de la selección de fagos, las regiones de codificación de anticuerpos del fago pueden aislarse y usarse para generar anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos humanos, o
- 10 cualquier otro fragmento de unión a antígeno deseado, y expresarse en cualquier huésped deseado, incluyendo células de mamífero, células de insectos, células vegetales, levaduras y bacterias. Por ejemplo, también se pueden emplear técnicas para producir de forma recombinante fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ usando métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en WO 92/22324; Mullinax *et al.*, *BioTechniques* 12: 864-869 (1992); Sawai *et al.*, *AJRI* 34: 26-34 (1995); y Better *et al.*, *Science* 240: 1041-1043 (1988).
- 15

Generalmente, los anticuerpos híbridos o los fragmentos de anticuerpos híbridos que se clonan en un vector de expresión pueden seleccionarse contra el antígeno apropiado para identificar variantes que mantuvieran una buena actividad de unión, debido a que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo estará presente en la superficie de la partícula del fago o fagémido.

20 Ver, por ejemplo, Barbas III *et al.*, *Phage Display, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001). Sin embargo, se podrían usar otros formatos de vector para este proceso, tales como la clonación de la biblioteca de fragmentos de anticuerpos en un vector de fago lítico (sistemas T7 modificados o Lambda Zap) para la selección y/o rastreo.

- 25 *Métodos alternativos de producción de anticuerpos.* Los anticuerpos también pueden producirse induciendo la producción *in vivo* en la población de linfocitos o seleccionando bibliotecas de inmunoglobulinas recombinantes o paneles de reactivos de unión altamente específicos (Orlandi *et al.*, *PNAS* 86: 3833-3837 (1989); Winter, G. *et al.*, *Nature*, 349: 293-299 (1991)).
- 30 Alternativamente, pueden usarse técnicas para la producción de anticuerpos monocatenarios. Los anticuerpos monocatenarios (scFv) comprenden una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera conectada con un péptido enlazador (típicamente alrededor de 5 a 25 aminoácidos de longitud). En el scFv, las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera pueden derivarse del mismo anticuerpo o de diferentes
- 35 anticuerpos. Los scFvs se pueden sintetizar usando técnicas recombinantes, por ejemplo, mediante la expresión de un vector que codifica el scFv en un organismo huésped, tal como *E. coli*. El ADN que codifica scFv puede obtenerse realizando una amplificación utilizando un ADN

parcial que codifica la secuencia de aminoácidos completa o deseada de un ADN seleccionado de un ADN que codifica la cadena pesada o la región variable de la cadena pesada del anticuerpo mencionado anteriormente y un ADN que codifica la cadena ligera o la región variable de la cadena ligera del mismo como plantilla, mediante PCR usando un par de cebadores que definen ambos extremos de la misma, y realizando además la amplificación combinando un ADN que codifica una porción polipeptídica enlazadora y un par de cebadores que definen ambos extremos de la misma, para ligar ambos extremos del enlazador a la cadena pesada y la cadena ligera, respectivamente. Puede obtenerse un vector de expresión que contiene el ADN que codifica scFv y un huésped transformado por el vector de expresión según métodos convencionales conocidos en la técnica.

También se pueden generar fragmentos de unión a antígeno, por ejemplo, los fragmentos $F(ab')_2$ que se pueden producir mediante digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo y los fragmentos Fab que se pueden generar al reducir los puentes disulfuro de fragmentos $F(ab')_2$. Alternativamente, se pueden construir bibliotecas de expresión de Fab para permitir una identificación rápida y fácil de fragmentos de Fab monoclonales con la especificidad deseada (Huse et al., *Science*, 256: 1275-1281 (1989)).

Modificaciones de anticuerpos. Los anticuerpos de la presente descripción pueden multimerizarse para aumentar la afinidad por un antígeno. El anticuerpo a multimerizar puede ser un tipo de anticuerpo o una pluralidad de anticuerpos que reconocen una pluralidad de epítomos del mismo antígeno. Como método de multimerización del anticuerpo, se puede ejemplificar la unión del dominio CH3 de IgG a dos moléculas scFv, la unión a estreptavidina, la introducción de un motivo hélice-giro-hélice y similares.

Las composiciones de anticuerpos descritas en la presente pueden estar en forma de un conjugado formado entre cualquiera de estos anticuerpos y otro agente (inmunoconjugado). En un aspecto, los anticuerpos descritos en la presente se conjugan con material radiactivo. En otro aspecto, los anticuerpos descritos en la presente pueden unirse a varios tipos de moléculas, tales como polietilenglicol (PEG).

Detección de anticuerpos. Se pueden usar varios inmunoensayos para el cribado para identificar anticuerpos que tienen la especificidad deseada. Numerosos protocolos para ensayos de unión competitiva o inmunorradiométricos que usan anticuerpos policlonales o monoclonales con especificidades establecidas son bien conocidos en la técnica. Dichos inmunoensayos implican típicamente la medición de la formación de complejos entre el antígeno relevante o cualquier fragmento u oligopéptido del mismo y su anticuerpo específico. Puede usarse un inmunoensayo a base de monoclonales de dos sitios que utiliza anticuerpos monoclonales específicos para dos epítomos de antígeno relevantes que no interfieren, pero también puede emplearse un ensayo de unión competitiva (Maddox et al., *J. Exp. Med.*, 158: 1211-1216 (1983)).

Purificación de anticuerpos. Los anticuerpos descritos en la presente se pueden purificar hasta la homogeneidad. La separación y purificación de los anticuerpos se puede realizar empleando métodos convencionales de separación y purificación de proteínas.

Sólo a modo de ejemplo, el anticuerpo puede separarse y purificarse seleccionando y combinando apropiadamente el uso de columnas de cromatografía, filtros, ultrafiltración, precipitación salina, diálisis, electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida, electroforesis de enfoque isoeléctrico y similares. *Estrategias para la purificación y caracterización de proteínas: A Laboratory Course Manual*, Daniel R. Marshak et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); *Antibodies: A Laboratory Manual*. Ed Harlow & David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988).

Los ejemplos de cromatografía incluyen cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de fase inversa y cromatografía de adsorción. En un aspecto, la cromatografía se puede realizar empleando cromatografía líquida como cromatografía líquida de alta resolución ("HPLC", por sus siglas en inglés) o cromatografía líquida de proteína rápida ("FPLC", por sus siglas en inglés).

En un aspecto, se puede usar una columna de proteína A o una columna de proteína G en la cromatografía de afinidad. Otras columnas ejemplares incluyen una columna de Proteína A, Hyper D, POROS, Sepharose F.F. (Pharmacia) y similares.

20 ***Anticuerpos biespecíficos***

También se proporcionan en la presente construcciones de anticuerpos biespecífico que comprenden cualquier anticuerpo de NKG2D o de un antígeno tumoral, por ejemplo, el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-NKG2D y un dominio de unión al antígeno dirigido al tumor de un anticuerpo. Los dominios de unión al antígeno pueden ser de cualquier especie apropiada, por ejemplo, murina, humana o una secuencia humanizada. En un aspecto, el anticuerpo dirigido al tumor comprende anti-CS1 o anti-BCMA. También incluye cualquier molécula que se una a estas dos proteínas. Por ejemplo, MICA, MICB y ULBPs. En un aspecto, el CAR puede ser CS1 CAR y la parte biespecífica se puede reemplazar con scFv anti-BCMA. En un aspecto, el anticuerpo dirigido al tumor comprende anti-CS1 o anti-BCMA. Un ejemplo de este tipo se describe en PCT/US2016/018955, registrado el 22 de febrero de 2016, que se incorpora en la presente a modo de referencia, y que específicamente incluye el polinucleótido y la secuencia de aminoácidos de los mismos.

En un aspecto, al menos uno de los dos dominios de unión a antígeno es específico para un antígeno que se coexpresa con un primer antígeno predeterminado. Por ejemplo, en el caso de MM, BCMA y CS1 se coexpresan en MM, y se seleccionó CS1 para complementar el dominio de unión al antígeno BCMA de una construcción de CAR. Alternativamente, BCMA puede complementar un CAR anti-CS1.

En un aspecto adicional, los dominios de unión a antígeno comprenden, o consisten esencialmente en, o además consisten en un fragmento scFv, que está opcionalmente optimizado por codones. En un aspecto adicional, los dominios de unión a antígenos biespecíficos son las cadenas ligeras y pesadas variables que están unidas por un enlazador peptídico. En general, los dominios de unión a antígeno se pueden unir mediante un enlazador peptídico, por ejemplo, un enlazador proteico no inmunogénico derivado de la aldosa de músculo humano³⁵.

También se proporcionan ácidos nucleicos aislados que codifican los anticuerpos biespecíficos. Los ácidos nucleicos pueden comprender además las secuencias reguladoras necesarias, por ejemplo, un promotor para la expresión en una célula huésped, por ejemplo, una célula huésped de mamífero o humana, tal como una célula T y/o un potenciador. En un aspecto, el promotor es un CMV o un promotor de EF1 alfa. El ácido nucleico aislado puede comprender además polinucleótidos que codifican marcadores detectables, tales como GFP, que pueden localizarse aguas abajo del polinucleótido que codifica BsAb y regularse a partir de un elemento promotor separado, por ejemplo, un promotor de EF1 alfa. Como es evidente para el experto en la técnica, el promotor o promotores se seleccionan para el sistema de expresión del huésped.

El ácido nucleico aislado se puede insertar en un vector de expresión, por ejemplo, un vector lentiviral, entre las LTRs 5' y 3'. La Figura 1B es un ejemplo de construcción de vector lentiviral de esta descripción. Como resultará evidente para el experto en la técnica, las construcciones pueden no comprender un péptido marcador o un marcador de purificación.

Construcciones de BsAb-CAR

En otro aspecto, en la presente se proporcionan ácidos nucleicos aislados que codifican, en una construcción, una construcción de CAR y un anticuerpo biespecífico como se describió anteriormente ("construcción de BsAb-CAR"). Los dominios de unión al antígeno pueden ser de cualquier especie apropiada, por ejemplo, murina, humana o una secuencia humanizada. En un aspecto, el ácido nucleico aislado codifica un fragmento de unión a antígeno que se dirige a BCMA y un anticuerpo biespecífico, por ejemplo, un scFv de un anticuerpo anti-CS1 y un scFv de un anticuerpo anti-NKG2D, unidos por un ácido nucleico que codifica un enlazador proteico no inmunogénico, tal como de la aldosa de músculo humano. En un aspecto, el ácido nucleico que codifica la construcción de CAR se localiza en 5' con respecto al ácido nucleico que codifica BsAb. En un aspecto, un elemento T2A está ubicado entre el polinucleótido CAR ubicado en 5' y el BsAb ubicado en 3'. Los ácidos nucleicos pueden comprender además las secuencias reguladoras necesarias, por ejemplo, un promotor para la expresión en una célula huésped, por ejemplo, una célula huésped de mamífero o humana, tal como una célula T. En un aspecto, el promotor es un EF1a o un promotor de CMV ubicado en 5' del polinucleótido que codifica el CAR. En un aspecto adicional, el ácido nucleico aislado puede comprender además

polinucleótidos que codifican marcadores detectables, tales como GFP, que pueden estar aguas abajo del polinucleótido BsAb y bajo el control de un elemento promotor separado, por ejemplo, un promotor de EF1 alfa. Como es evidente para el experto en la técnica, el promotor o promotores se seleccionan para el sistema de expresión del huésped.

- 5 El ácido nucleico aislado se puede insertar en un vector de expresión, por ejemplo, un vector lentiviral, entre las LTRs 5' y 3'. La Figura 3A es un ejemplo de construcción de vector lentiviral de esta descripción. Como resultará evidente para el experto en la técnica, las construcciones pueden no comprender un péptido marcador o un marcador de purificación.

Células huéspedes y procesos para preparar CARs

- 10 Los aspectos de la presente descripción se refieren a una célula aislada que comprende un CAR, un BsAb y un BsAb CAR, así como métodos para producir tales células. La célula es procarionota o eucariota. En un aspecto, la célula es una célula T, una célula B, una célula NK, una célula dendrítica, una célula mieloides, un monocito, un macrófago, cualquier subconjunto de los mismos o cualquier otra célula inmune. La célula eucariota puede ser de cualquier especie preferida, por ejemplo, una célula animal, una célula de mamífero, tal como una célula humana, felina o canina. Las células pueden derivar de pacientes, donantes o líneas celulares, tales como las disponibles en el mercado. Las células pueden ser autólogas o alogénicas para el sujeto que está siendo tratado.

- En modalidades específicas, la célula aislada comprende, o alternativamente consiste esencialmente en, o además consiste en un CAR exógeno o un BsAb-CAR que comprende, o alternativamente consiste esencialmente en, o además consiste en un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de un cáncer o tumor, un dominio de bisagra CD8 α , un dominio transmembrana CD8 α , una región de señalización coestimuladora de CD28 y/o una región de señalización coestimuladora de 4-1BB, y un dominio de señalización de CD3 zeta. En una modalidad separada, la célula aislada comprende además un BsAb como se describe en la presente. En otro aspecto más, la célula comprende el BsAb como se describe en la presente. En determinadas modalidades, la célula aislada es una célula T, por ejemplo, una célula T animal, una célula T de mamífero, una célula T felina, una célula T canina o una célula T humana. En determinadas modalidades, la célula aislada es una célula NK, por ejemplo, una célula NK animal, una célula NK de mamífero, una célula NK felina, una célula NK canina o una célula NK humana. En determinadas modalidades, la célula aislada es una célula B, por ejemplo, una célula B animal, una célula B de mamífero, una célula B felina, una célula B canina o una célula B humana. Se entiende que se aplican las mismas o similares modalidades para cada especie con respecto a las células dendríticas, células mieloides, monocitos, macrófagos, cualquier subconjunto de estos o las células T, células NK y células B descritas y/o cualesquiera otras células inmunes. En un aspecto, la célula es una célula T que se ha modificado para
- 20
- 25
- 30
- 35

eliminar la expresión de CD52 usando tecnología de edición de genes, por ejemplo, CRISPR o TALEN.

En determinadas modalidades, los métodos para producir las células que expresan BsAb, CAR y/o BsAb CAR se describen en el método que comprende, o alternatively, consiste esencialmente en transducir una población de células aisladas con una secuencia de ácido nucleico que codifica BsAb, o que además consiste en la transducción de una población de células aisladas con una secuencia de ácido nucleico que codifica BsAb, CAR, BsAb y CAR, y/o BsAb CAR. En un aspecto adicional, se selecciona una subpoblación de células que se han transducido con éxito con la secuencia de ácido nucleico. En algunas modalidades, las células aisladas son células T, una célula T animal, una célula T de mamífero, una célula T felina, una célula T canina o una célula T humana, produciendo así el BsAb, el CAR, el BsAb y CAR, y/o las células T BsAb CAR. En determinadas modalidades, la célula aislada es una célula NK, por ejemplo, una célula NK animal, una célula NK de mamífero, una célula NK felina, una célula NK canina o una célula NK humana, produciendo así el BsAb, el CAR, el BsAb y CAR, y/o las células NK BsAb CAR. En algunas modalidades, las células aisladas son células B, una célula B animal, una célula B de mamífero, una célula B felina, una célula B canina o una célula B humana, produciendo así el BsAb, el CAR, el BsAb y CAR, y/o las células B BsAb CAR. Se entiende que se aplican las mismas o similares modalidades para cada especie con respecto a las células dendríticas, células mieloides, monocitos, macrófagos, cualquier subconjunto de estos o las células T, células NK y células B descritas y/o cualesquiera otras células inmunes. En un aspecto, la célula es una célula T que se ha modificado para eliminar la expresión de CD52 usando tecnología de edición de genes, por ejemplo, CRISPR o TALEN. En un aspecto, las células son autólogas o alogénicas para el sujeto que está siendo tratado.

Fuentes de células aisladas. Antes de la expansión y modificación genética de las células descritas en la presente, las células se pueden obtener de un sujeto, por ejemplo, en modalidades que implican terapia autóloga, o una línea o cultivo celular disponible comercialmente, o una célula madre, tal como una célula madre pluripotente inducida ("iPSC", por sus siglas en inglés).

Las células pueden obtenerse de varias fuentes en un sujeto, incluyendo células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de ganglios linfáticos, sangre del cordón umbilical, tejido del timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, derrame pleural, tejido del bazo y tumores.

Los métodos para aislar células relevantes son bien conocidos en la técnica y pueden adaptarse fácilmente a la presente aplicación; un método ejemplar se describe en los ejemplos a continuación. Los métodos de aislamiento para su uso en relación con esta descripción incluyen, pero no se limitan al sistema de perlas Dynabeads® de Life Technologies; tecnologías EasySep™, RoboSep™, RosetteSep™, SepMate™ de STEMcell; kits de separación de células

MACS™ de Miltenyi Biotec, y otros kits de separación y aislamiento de células disponibles comercialmente. Pueden aislarse subpoblaciones particulares de células inmunes mediante el uso de perlas u otros agentes de unión disponibles en tales kits específicos para marcadores de superficie celular únicos. Por ejemplo, se pueden usar microperlas CD4+ y CD8+ de MACS™ para aislar células T CD4+ y CD8+. Algunos ejemplos no limitativos de células que pueden aislarse de acuerdo con técnicas conocidas incluyen células T voluminosas, células T NK y células T gamma delta.

Alternativamente, las células se pueden obtener a través de cultivos celulares disponibles comercialmente, que incluyen, pero no se limitan a, para células T, las líneas BCL2 (AAA) Jurkat (ATCC® CRL-2902™), BCL2 (S70A) Jurkat (ATCC® CRL-2900™), BCL2 (S87A) Jurkat (ATCC® CRL-2901™), BCL2 Jurkat (ATCC® CRL-2899™), Neo Jurkat (ATCC® CRL-2898™); para células B, las líneas AHH-1 (ATCC® CRL-8146™), BC-1 (ATCC® CRL-2230™), BC-2 (ATCC® CRL-2231™), BC-3 (ATCC® CRL-2277™), CA46 (ATCC® CRL-1648™), DG-75 [D.G.-75] (ATCC® CRL-2625™), DS-1 (ATCC® CRL-11102™), EB-3 [EB3] (ATCC® CCL-85™), Z-138 (ATCC #CRL-3001), DB (ATCC CRL-2289), Toledo (ATCC CRL-2631), Pfiffer (ATCC CRL-2632), SR (ATCC CRL-2262), JM-1 (ATCC CRL-10421), NFS-5 C-1 (ATCC CRL-1693); NFS-70 C10 (ATCC CRL-1694), NFS-25 C-3 (ATCC CRL-1695), y SUP-B15 (ATCC CRL-1929); y, para células NK, las líneas NK-92 (ATCC® CRL-2407™), NK-92MI (ATCC® CRL-2408™). Otros ejemplos incluyen, entre otros, líneas de células T maduras, por ejemplo, Deglis, EBT-8, HPB-MLp-W, HUT 78, HUT 102, Karpas 384, Ki 225, My-La, Se-Ax, SKW-3, SMZ-1 y T34; líneas de células T inmaduras, por ejemplo, ALL-SIL, Be13, CCRF-CEM, CML-T1, DND-41, DU.528, EU-9, HD-Mar, HPB-ALL, H-SB2, HT-1, JK-T1, Jurkat, Karpas 45, KE-37, KOPT-K1, K-T1, L-KAW, Loucy, MAT, MOLT-1, MOLT 3, MOLT-4, MOLT 13, MOLT-16, MT-1, MT-ALL, P12/Ichikawa, Peer, PER0117, PER-255, PF-382, PFI-285, RPMI-8402, ST-4, SUP-T1 a T14, TALL-1, TALL-101, TALL-103/2, TALL-104, TALL-105, TALL-106, TALL-107, TALL-197, TK-6, TLBR-1, -2, -3, y -4, CCRF-HSB-2 (CCL-120.1), J.RT3-T3.5 (ATCC TIB-153), J45.01 (ATCC CRL-1990), J.CaM1.6 (ATCC CRL-2063), RS4;11 (ATCC CRL-1873), CCRF-CEM (ATCC CRM-CCL-119); líneas de linfoma cutáneo de células T, por ejemplo, HuT78 (ATCC CRM-TIB-161), MJ[G11] (ATCC CRL-8294), HuT102 (ATCC TIB-162); líneas de células B derivadas de linfomas anaplásicos y de células grandes, por ejemplo, DEL, DL-40, FE-PD, JB6, Karpas 299, Ki-JK, Mac-2A Ply1, SR-786, SU-DHL-1, -2, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, y -16, DOHH-2, NU-DHL-1, U-937, Granda 519, USC-DHL-1, RL; linfomas de Hodgkin, por ejemplo, DEV, HD-70, HDLM-2, HD-MyZ, HKB-1, KM-H2, L 428, L 540, L1236, SBH-1, SUP-HD1 y SU/RH-HD-I; y líneas NK, tales como ANK1, KHYG-1, NKL, NK-YS, NOI-90, e YT. Las líneas celulares de leucemia nula, que incluyen, entre otras, REH, NALL-1, KM-3, L92-221, son otra fuente comercial de células inmunes, al igual que las líneas celulares derivadas de otras leucemias y linfomas, tal como la eritroleucemia K562, leucemia monocítica THP-1, linfoma U937,

eritroleucemia HEL, leucemia HL60, leucemia HMC-1, leucemia KG-1, mieloma U266. Las fuentes ejemplares no limitativas para tales líneas celulares disponibles comercialmente incluyen la American Type Culture Collection, o ATCC, (atcc.org/) y la German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (dsmz.de/).

5 En algunas modalidades, las células T que expresan los CARs descritos pueden modificarse adicionalmente para reducir o eliminar la expresión de los TCRs endógenos. La reducción o eliminación de los TCRs endógenos puede reducir los efectos fuera del objetivo y aumentar la eficacia de las células T. Las células T que carecen de forma estable de la expresión de un TCR funcional pueden producirse usando diversos métodos. Las células T internalizan, clasifican y degradan todo el receptor de células T como un complejo, con una vida media de aproximadamente 10 horas en las células T en reposo y 3 horas en las células T estimuladas (von Essen, M. et al. 2004. J. Immunol. 173:384-393). El funcionamiento adecuado del complejo TCR requiere la proporción estequiométrica adecuada de las proteínas que componen el complejo TCR. La función de TCR también requiere dos proteínas zeta de TCR funcionales con motivos de activación de inmunoreceptor basado en tirosina ("ITAM", por sus siglas en inglés). La activación del TCR tras el acoplamiento de su ligando MHC-péptido requiere el acoplamiento de varios TCRs en la misma célula T, que deben señalizar correctamente. Por lo tanto, si un complejo de TCR se desestabiliza con proteínas que no se asocian adecuadamente o no pueden señalizar de manera óptima, la célula T no se activará lo suficiente para comenzar una respuesta celular.

Por consiguiente, en algunas modalidades, la expresión de TCR puede eliminarse usando interferencia de ARN (por ejemplo, ARNhc, ARNip, miARN, etc.), CRISPR u otros métodos que se dirigen a los ácidos nucleicos que codifican TCRs específicos (por ejemplo, TCR- α y TCR- β) y/o cadenas CD3 en células T primarias. Al bloquear la expresión de una o más de estas proteínas, la célula T ya no producirá uno o más de los componentes clave del complejo TCR, desestabilizando así el complejo TCR y previniendo la expresión en la superficie celular de un TCR funcional. Aunque algunos complejos de TCR se pueden reciclar a la superficie celular cuando se usa la interferencia de ARN, el ARN (por ejemplo, ARNhc, ARNip, miARN, etc.) evitará una nueva producción de proteínas TCR que provoque la degradación y eliminación de todo el complejo TCR, dando como resultado la producción de una célula T que tiene una deficiencia estable en la expresión de TCR funcional.

La expresión de ARN inhibidores (por ejemplo, ARNhc, ARNip, miARN, etc.) en células T primarias se puede lograr usando cualquier sistema de expresión convencional, por ejemplo, un sistema de expresión lentiviral. Aunque los lentivirus son útiles para dirigirse a las células T primarias en reposo, no todas las células T expresarán los ARNhc. Aunque los lentivirus son útiles para dirigirse a las células T primarias en reposo, no todas las células T expresarán los ARNhc. Por lo tanto, las células T que retienen una expresión de TCR de moderada a alta

después de la transducción viral pueden eliminarse, por ejemplo, mediante técnicas de clasificación o separación de células, de modo que las células T restantes sean deficientes en TCR o CD3 de la superficie celular, lo que permite la expansión de una población aislada de células T deficientes en la expresión de TCR o CD3 funcional.

- 5 La expresión de CRISPR en células T primarias se puede lograr utilizando sistemas CRISPR/Cas convencionales y ARNs guías específicos a los TCR objetivo. En la técnica se conocen sistemas de expresión adecuados, por ejemplo, sistemas de expresión lentivirales o adenovirales. De manera similar a la administración de ARN inhibidores, el sistema CRISPR puede usarse para dirigirse específicamente a las células T primarias en reposo u otras células
- 10 inmunes adecuadas para la terapia con células CAR. Además, en la medida en que la edición de CRISPR no sea satisfactoria, las células se pueden seleccionar para que tengan éxito de acuerdo con los métodos descritos anteriormente. Por ejemplo, como se señaló anteriormente, las células T que retienen una expresión de TCR de moderada a alta después de la transducción viral pueden eliminarse, por ejemplo, mediante técnicas de clasificación o separación de células,
- 15 de modo que las células T restantes sean deficientes en TCR o CD3 de la superficie celular, lo que permite la expansión de una población aislada de células T deficientes en la expresión de TCR o CD3 funcional. Se entiende además que una construcción de edición de CRISPR puede ser útil tanto para eliminar el TCR endógeno como para eliminar las construcciones de CAR descritas en la presente. Por consiguiente, se entiende que se puede diseñar un sistema
- 20 CRISPR para lograr uno o ambos de estos propósitos.

Vectores. Las células CAR se pueden preparar usando vectores. Los aspectos de la presente descripción se relacionan con una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica (i) un CAR o (ii) un polinucleótido que codifica una molécula inmunorreguladora y vectores que comprenden, o alternativamente que consisten esencialmente en, o que además consisten en

25 uno o ambos de estos ácidos nucleicos y/o complementos y/o equivalentes de cada uno de ellos.

En algunas modalidades, la secuencia de ácido nucleico aislada codifica un CAR que comprende, o alternativamente consiste esencialmente en, o además consiste en un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo dirigido al cáncer o tumor, un dominio de bisagra de CD8

30 α , un dominio transmembrana de CD8 α , una región de señalización coestimuladora de CD28 y/o una región de señalización coestimuladora de 4-1BB, y un dominio de señalización de CD3 zeta. En modalidades específicas, la secuencia de ácido nucleico aislada comprende, o alternativamente consiste esencialmente en la misma, o además consiste en secuencias que codifican (a) un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo dirigido al cáncer o tumor seguido

35 de (b) un dominio de bisagra de CD8 α , (c) un dominio transmembrana de CD8 α seguido de (d) una región de señalización coestimuladora de CD28 y/o una región de señalización coestimuladora de 4-1BB seguida de (e) un dominio de señalización de CD3 zeta.

En algunas modalidades, la secuencia de ácido nucleico aislada codifica un CAR y comprende, o alternatively consiste esencialmente en, o además consiste en una secuencia consenso de Kozak aguas arriba de la secuencia que codifica el dominio de unión al antígeno del anticuerpo dirigido al cáncer o al tumor.

5 En un aspecto, el dominio de unión al antígeno se dirige a BCMA.

En algunas modalidades, el ácido nucleico aislado comprende, o alternatively consiste esencialmente en, o además consiste en un polinucleótido que codifica un anticuerpo biespecífico. En ciertas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende, o alternatively consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en las regiones CDR relevantes de un anticuerpo contra NKG2D y, opcionalmente, SLAMF7 (también conocido como CS1 o CD319),
 10 que opcionalmente están optimizados por codones, o un equivalente de cada uno de ellos. En ciertas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende, o alternatively consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en las regiones CDR relevantes de un anticuerpo contra NKG2D y, opcionalmente, SLAMF7 (también conocido como CS1 o CD319)
 15 (que opcionalmente están optimizados por codones), o un equivalente de cada uno de ellos. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende, o alternatively consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en la región variable de cadena pesada y/o cadena ligera de un anticuerpo contra NKG2D y, opcionalmente, SLAMF7 (también conocido como CS1 o CD319) (que están opcionalmente optimizados por codones), y/o un equivalente
 20 de cada uno de ellos. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un fragmento variable monocatenario (scFV) derivado de un anticuerpo contra NKG2D y, opcionalmente, un fragmento variable monocatenario (scFV) derivado de SLAMF7 (también conocido como CS1 de CD319) (que están opcionalmente optimizados por codones), y/o un equivalente de cada uno de ellos. En algunas modalidades, el ácido nucleico aislado
 25 comprende, o alternatively consiste esencialmente en, o además consiste en una secuencia de polinucleótidos que codifica el anticuerpo biespecífico ligado operativamente a un promotor que puede generarse de acuerdo con el método descrito anteriormente.

En algunas modalidades, el ácido nucleico aislado comprende un marcador detectable y/o un polinucleótido que confiere resistencia a los antibióticos. En un aspecto, el marcador o
 30 polinucleótido son útiles para seleccionar células transducidas con éxito con los ácidos nucleicos aislados.

En algunas modalidades, la secuencia de ácido nucleico aislada está comprendida dentro de un vector. En ciertas modalidades, el vector es un plásmido. En otras modalidades, el vector es un vector viral. Los ejemplos no limitativos de los mismos incluyen, sin limitación,
 35 un vector retroviral, un vector lentivírico, un vector adenoviral y un vector viral adenoasociado. En modalidades específicas, el vector es un vector lentiviral.

La preparación de vectores ejemplares y la generación de células que expresan CAR usando dichos vectores se analiza en detalle en los ejemplos a continuación. En resumen, la expresión de ácidos nucleicos naturales o sintéticos que codifican CAR o moléculas inmunorreguladoras se logra típicamente al ligar operativamente un ácido nucleico que codifica el polipéptido CAR o porciones del mismo a un promotor e incorporando la construcción en un vector de expresión. Puede usarse un método similar para construir la secuencia de ácido nucleico aislada que comprende un polinucleótido que codifica una molécula inmunorreguladora. Los vectores pueden ser adecuados para eucariotas de replicación e integración. Los métodos para producir células que comprenden vectores y/o ácidos nucleicos exógenos son bien conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York).

En un aspecto, el término “vector” se refiere a un vector recombinante que conserva la capacidad de infectar y transducir células que no se dividen y/o que se dividen lentamente e integrarse en el genoma de la célula objetivo. En varios aspectos, el vector se deriva o se basa en un virus de tipo silvestre. En aspectos adicionales, el vector se deriva o se basa en un lentivirus de tipo silvestre. Ejemplos de tales incluyen, sin limitación, virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus de anemia infecciosa equina (VAIE), virus de inmunodeficiencia en simios (VIS) y virus de inmunodeficiencia felina (VIF). Alternativamente, se contempla que se puedan usar otros retrovirus como base para un esqueleto de vector tal como el virus de la leucemia murina (VLM). Será evidente que un vector viral según la descripción no necesita estar confinado a los componentes de un virus particular. El vector viral puede comprender componentes derivados de dos o más virus diferentes y también puede comprender componentes sintéticos. Los componentes del vector se pueden manipular para obtener las características deseadas, tales como la especificidad de la célula objetivo.

Los vectores recombinantes de esta descripción se derivan de primates y no primates. Los ejemplos de lentivirus de primates incluyen el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el agente causante del síndrome de inmunodeficiencia humana adquirida (SIDA) y el virus de la inmunodeficiencia en simios (VIS). El grupo de virus lentivirales no primates incluye el prototipo de “virus lento” virus visna/maedi (“VMV”, por sus siglas en inglés), así como el virus de la artritis-encefalitis caprina (“CAEV”, por sus siglas en inglés) relacionado, el virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), y el virus de la inmunodeficiencia felina (VIF) y virus de inmunodeficiencia bovina (BIV) descritos más recientemente. Los vectores lentivirales recombinantes de la técnica anterior se conocen en la técnica, por ejemplo, ver las patentes de EE.UU. No. 6,924,123; 7,056,699; 7,419,829 y 7,442,551, que se incorporan en la presente a modo de referencia.

La patente de EE.UU. No. 6,924,123 describe que cierta secuencia retroviral facilita la integración en el genoma de la célula objetivo. Esta patente enseña que cada genoma retroviral

comprende genes denominados gag, pol y env que codifican proteínas y enzimas viriónicas. Estos genes están flanqueados en ambos extremos por regiones llamadas repeticiones terminales largas (LTRs). Las LTRs son responsables de la integración proviral y la transcripción. También actúan como secuencias potenciadoras-promotoras. En otras palabras,

5 las LTRs pueden controlar la expresión de los genes virales. La encapsidación de los ARNs retrovirales se produce en virtud de una secuencia psi ubicada en el extremo 5' del genoma viral. Las LTRs en sí mismos son secuencias idénticas que se pueden dividir en tres elementos, que se denominan U3, R y U5. U3 se deriva de la secuencia única del extremo 3' del ARN. R se deriva de una secuencia repetida en ambos extremos del ARN y U5 se deriva de la secuencia

10 única del extremo 5' del ARN. Los tamaños de los tres elementos pueden variar considerablemente entre diferentes retrovirus. Para el genoma viral y el sitio de la adición (terminación) de poli(A) está en el límite entre R y U5 en la LTR del lado derecho. U3 contiene la mayoría de los elementos de control transcripcional del provirus, que incluyen el promotor y múltiples secuencias potenciadoras que responden a proteínas activadoras transcripcionales

15 celulares y, en algunos casos, virales.

Con respecto a los genes estructurales gag, pol y env mismos, gag codifica la proteína estructural interna del virus. La proteína Gag se procesa proteolíticamente en las proteínas maduras MA (matriz), CA (cápside) y NC (nucleocápside). El gen pol codifica la transcriptasa inversa ("RT", por sus siglas en inglés), que contiene ADN polimerasa, RNasa H asociada e

20 integrasa (IN), que median la replicación del genoma.

Para la producción de partículas de vectores virales, el genoma de ARN del vector se expresa a partir de una construcción de ADN que lo codifica, en una célula huésped. Los componentes de las partículas no codificadas por el genoma del vector se proporcionan en trans mediante secuencias de ácido nucleico adicionales (el "sistema de empaquetamiento", que

25 normalmente incluye uno o ambos genes gag/pol y env) expresadas en la célula huésped. El conjunto de secuencias requeridas para la producción de las partículas del vector viral puede introducirse en la célula huésped mediante transfección transitoria, o pueden integrarse en el genoma de la célula huésped, o pueden proporcionarse en una mezcla de formas. Las técnicas implicadas son conocidas por los expertos en la técnica.

30 Los vectores retrovirales para su uso en esta descripción incluyen, pero no se limitan a, el sistema "ViraPower" de las versiones 4, 6 y 6.2 de la serie pLenti de Invitrogen. Fabricado por Lentigen Corp.; pHIV-7-GFP, laboratorio generado y utilizado por el City of Hope Research Institute; vector lentiviral "Lenti-X", pLVX, fabricado por Clontech; pLKO.1-puro, fabricado por Sigma-Aldrich; pLemiR, fabricado por Open Biosystems; y pLV, generado en laboratorio y

35 utilizado por Charité Medical School, Institute of Virology (CBF), Berlín, Alemania.

Se conocen métodos adicionales para introducir ácidos nucleicos exógenos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, el suministro de genes usando uno o más de electroporación de ARN, nanotecnología, vectores de la bella durmiente, retrovirus y/o adenovirus.

Independientemente del método utilizado para introducir ácidos nucleicos exógenos en una célula huésped o exponer una célula al inhibidor de la presente descripción, con el fin de confirmar la presencia de la secuencia de ADN recombinante en la célula huésped, se pueden realizar diversos ensayos. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos “biológicos moleculares” bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como los análisis de Southern blot y Northern blot, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (“RT-PCR”, por sus siglas en inglés) y PCR; ensayos “bioquímicos”, tales como detectar la presencia o ausencia de un péptido particular, por ejemplo, por medios inmunológicos (ELISA y Western blot) o mediante ensayos descritos en la presente para identificar agentes que caen dentro del alcance de la descripción.

Vector de empaquetamiento y líneas celulares. Los ácidos nucleicos aislados se pueden empaquetar en un sistema de empaquetamiento retroviral usando un vector de empaquetamiento y líneas celulares. El vector de empaquetamiento incluye, pero no se limita a, vector retroviral, vector lentiviral, vector adenoviral y vector viral adenoasociado. El vector de empaquetamiento contiene elementos y secuencias que facilitan la entrega de material genético a las células. Por ejemplo, las construcciones retrovirales son vectores de empaquetamiento que comprenden al menos una secuencia de ADN auxiliar retroviral derivada de un genoma retroviral de replicación incompetente que codifica en trans todas las proteínas de virión necesarias para empaquetar un vector retroviral de replicación incompetente y para producir proteínas de virión capaces de empaquetar el vector retroviral incompetente para la replicación a títulos elevados, sin la producción de virus auxiliares competentes para la replicación. La secuencia de ADN retroviral carece de la región que codifica el potenciador nativo y/o el promotor de LTR 5' viral del virus, y carece de la secuencia de función psi responsable del empaquetamiento del genoma auxiliar y de LTR 3', pero codifica un sitio de poliadenilación extraño, por ejemplo, el sitio de poliadenilación del virus símico 40 (“SV40”, por sus siglas en inglés), y un potenciador y/o promotor extraño que dirige la transcripción eficaz en un tipo de célula en donde se desea la producción de virus. El retrovirus es un virus de la leucemia, tal como el virus de la leucemia murina de Moloney (“MMLV”, por sus siglas en inglés), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o el virus de la leucemia del mono de Gibbon (“GALV”, por sus siglas en inglés). El potenciador y promotor extraño puede ser el potenciador y promotor temprano inmediato (“IE”, por sus siglas en inglés) del citomegalovirus humano (“HCMV”, por sus siglas en inglés), el potenciador y promotor (región U3) del virus del sarcoma murino de Moloney (“MMSV”, por sus siglas en inglés), la región U3 del virus del sarcoma de Rous (“RSV”, por sus siglas en inglés), la región U3 del virus de enfoque de formación de bazo (“SFFV”, por

sus siglas en inglés), o el potenciador IE de HCMV unido al promotor nativo del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV). El vector de empaquetamiento retroviral puede consistir en dos secuencias de ADN auxiliares retrovirales codificadas por vectores de expresión a base de plásmidos, por ejemplo, cuando una primera secuencia auxiliar contiene un ADNc que

5 codifica las proteínas gag y pol de MMLV o GALV ecotrópicos, y una segunda secuencia auxiliar contiene un ADNc que codifica la proteína env. El gen Env, que determina el rango de huéspedes, puede derivarse de los genes que codifican las proteínas env del virus de la leucemia murina xenotrópica, anfotrópica, ecotrópica, politrópica (formación de enfoque de visión) o 10A1, o el virus de la leucemia del mono Gibbon (proteína env de GALV, la proteína

10 env del virus de inmunodeficiencia humana (gp160), la proteína G del virus de la estomatitis vesicular ("VSV", por sus siglas en inglés), los productos del gen env de la leucemia de células T humanas ("HTLV", por sus siglas en inglés) tipo I y II, gen de envoltura quimérico derivado de combinaciones de uno o más de los genes env antes mencionados o genes de envoltura quiméricos que codifican el citoplasma y transmembrana de los productos del gen env

15 mencionados anteriormente y un anticuerpo monoclonal dirigido contra una molécula de superficie específica en una célula objetivo deseada.

En el proceso de empaquetamiento, los vectores de empaquetamiento y los vectores retrovirales se cotransfectan transitoriamente en una primera población de células de mamíferos que son capaces de producir virus, tales como células renales embrionarias humanas, por

20 ejemplo células 293 (ATCC No. CRL1573, ATCC, Rockville, MD.) para producir sobrenadantes que contienen retrovirus recombinantes de títulos elevados. En otro método de la descripción, esta primera población de células transfectadas transitoriamente se cocultiva a continuación con células objetivo de mamífero, por ejemplo, linfocitos humanos, para transducir las células objetivo con el gen extraño con altas eficiencias. En otro método más de la invención, los

25 sobrenadantes de la primera población de células transfectadas transitoriamente descrita anteriormente se incuban con células objetivo de mamífero, por ejemplo linfocitos humanos o células madre hematopoyéticas, para transducir las células objetivo con el gen extraño con altas eficiencias.

En otro aspecto, los vectores de empaquetamiento se expresan de manera estable en

30 una primera población de células de mamíferos que son capaces de producir virus, tales como células renales embrionarias humanas, por ejemplo, células 293. Los vectores retrovirales o lentivirales se introducen en las células por cotransfección con un marcador seleccionable o infección con virus pseudotipados. En ambos casos, los vectores se integran. Alternativamente, los vectores pueden introducirse en un plásmido mantenido episómicamente. Se producen

35 sobrenadantes que contienen retrovirus recombinantes de títulos elevados.

Activación y expansión de células CAR. Ya sea antes o después de la modificación genética de las células para expresar un CAR deseable, las células pueden activarse y

expandirse usando métodos generalmente conocidos, tales como los descritos en las patentes de EE.UU. No. 6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358; 6,887,466; 6,905,681 ; 7, 144,575; 7,067,318; 7, 172,869; 7,232,566; 7, 175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; 6,867,041 y referencias tales como Lapateva et al. (2014) Crit Rev Oncog 19(1-2):121-32; Tam et al. (2003) Cytotherapy 5(3):259-72; Garcia-Marquez et al. (2014) Cytotherapy 16(11):1537-44. La estimulación *ex vivo* con el antígeno relevante para el tumor puede activar y expandir la subpoblación de células que expresan CAR seleccionada. Alternativamente, las células pueden activarse *in vivo* mediante la interacción con un antígeno relevante para el tumor.

En el caso de ciertas células inmunes, se pueden requerir poblaciones de células adicionales, ligandos solubles y/o citocinas, o agentes estimulantes para activar y expandir las células. Los reactivos relevantes son bien conocidos en la técnica y se seleccionan de acuerdo con principios inmunológicos conocidos. Por ejemplo, el ligando CD-40 soluble puede ser útil para activar y expandir ciertas poblaciones de células B; de manera similar, se pueden usar células alimentadoras irradiadas en el procedimiento para la activación y expansión de células NK.

Los métodos para activar células relevantes son bien conocidos en la técnica y pueden adaptarse fácilmente a la presente aplicación; un método ejemplar se describe en los ejemplos a continuación. Los métodos de aislamiento para su uso en relación con esta descripción incluyen, pero no se limitan a, kits de expansión y activación del sistema de perlas Dynabeads® de Life Technologies; kits de activación Phosflow™ de BD Biosciences, kits de activación/expansión MACS™ de Miltenyi Biotec y otros kits de células disponibles comercialmente específicos para los restos de activación de la célula relevante. Se pueden activar o expandir subpoblaciones particulares de células inmunes mediante el uso de perlas u otros agentes disponibles en tales kits. Por ejemplo, se pueden usar perlas α -CD3/ α -CD28 Dynabeads® para activar y expandir una población de células T aisladas.

Métodos de uso

Aplicación terapéutica. Los aspectos del método de la presente descripción se refieren a métodos para inhibir el crecimiento de un tumor o células cancerosas (por ejemplo, células MM) *in vitro* o *in vivo* y/o para tratar a un paciente con cáncer que lo necesite. En algunas modalidades, el tumor es un tumor sólido. En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer que afecta a la sangre y/o la médula ósea, por ejemplo, MM. En algunas modalidades, la célula cancerosa o tumoral expresa o sobreexpresa un antígeno canceroso o tumoral, por ejemplo, BCMA y/o CS1. Cuando se practican *in vitro*, los métodos proporcionan ensayos *in vitro* para la aplicación de la medicina de precisión y ensayos útiles para probar nuevas combinaciones y terapias.

En determinadas modalidades, estos métodos comprenden, o alternativamente consisten esencialmente en, o además consisten en, administrar al sujeto o paciente una

cantidad efectiva de la célula aislada que comprende el CAR. En modalidades adicionales, esta célula aislada comprende o expresa un CAR y/o un anticuerpo biespecífico. En algunas modalidades, el dominio de unión al antígeno del CAR comprende, o alternativamente consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en las regiones CDR relevantes de un anticuerpo para cualquiera de los antígenos de maduración de células B (BCMA) y/o SLAMF7 (también conocido como CS1 o CD319), y/o un equivalente de cada uno de ellos. En algunas modalidades, el dominio de unión al antígeno del CAR comprende, o alternativamente consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en la región variable de cadena pesada y/o cadena ligera de un anticuerpo contra cualquiera de los antígenos de maduración de células B (BCMA) y/o SLAMF7 (también conocido como CS1 o CD319), y/o un equivalente de cada uno de ellos. En otras modalidades más, la célula aislada es una célula T o una célula NK. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende, o alternativamente consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en un ligando NKG2D y, opcionalmente, un ligando SALMF7 (también conocido como CS1 o CD319). En ciertas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende, o alternativamente consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en las regiones CDR relevantes de un anticuerpo contra NKG2D y, opcionalmente, SLAMF7 (también conocido como CS1 o CD319), o un equivalente de cada uno de ellos. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende, o alternativamente consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en la región variable de cadena pesada y/o cadena ligera de un anticuerpo contra NKG2D y, opcionalmente, SLAMF7 (también conocido como CS1 o CD319), y/o un equivalente de cada uno de ellos. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un fragmento variable monocaténario (scFv) derivado de un anticuerpo contra NKG2D y, opcionalmente, un fragmento variable monocaténario (scFv) derivado de SLAMF7 (también conocido como CS1 de CD319), y/o un equivalente a cada uno de ellos. En algunas modalidades, la célula aislada es autóloga del sujeto o paciente que está siendo tratado. En un aspecto adicional, el tumor expresa un antígeno canceroso o tumoral y el sujeto ha sido seleccionado para la terapia mediante un diagnóstico, tal como el uso de un anticuerpo que reconoce y se une a los antígenos relevantes para el tumor o cáncer a los que se dirigen los CARs. El sujeto es un animal, un mamífero, un canino, un felino, un bovino, un equino, un murino o un paciente humano.

Las células CAR como se describen en la presente pueden administrarse solas o en combinación con el anticuerpo biespecífico descrito en la presente, diluyentes, agentes terapéuticos anticancerosos conocidos y/o con otros componentes tales como citocinas u otras poblaciones celulares que son inmunorreguladoras. Se pueden administrar como terapia de primera línea, terapia de segunda línea, terapia de tercera línea o terapia adicional. Los ejemplos no limitativos de terapias adicionales incluyen terapia citorreductora, tales como radioterapia, crioterapia o quimioterapia, o productos biológicos. Otros ejemplos no limitativos

incluyen otros tipos de células relevantes, tales como células inmunes no modificadas, células inmunes modificadas que comprenden vectores que expresan una o más moléculas inmunorreguladoras, o células CAR específicas para un antígeno diferente de los descritos en la presente. Al igual que con las células CAR de la presente descripción, en algunas modalidades, estas células pueden ser autólogas o alogénicas. Los regímenes de tratamiento apropiados serán determinados por el médico o veterinario tratante.

Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción se pueden administrar de una manera apropiada para la enfermedad que se va a tratar o prevenir. La cantidad y frecuencia de administración vendrán determinadas por factores tales como el estado del paciente y el tipo y gravedad de la enfermedad del paciente, aunque las dosis apropiadas pueden determinarse mediante ensayos clínicos. En un aspecto, se administran directamente mediante inyección directa o sistémicamente, como una inyección intravenosa.

Los aspectos de la descripción proporcionan un método ejemplar para determinar si es probable que un paciente responda o no responda a la terapia con CAR. El método comprende, o alternativamente consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en determinar la presencia o ausencia de necrosis en una muestra de tumor aislada del paciente y cuantificar la cantidad de células cancerosas o tumorales que expresan el antígeno canceroso o tumoral. En determinadas modalidades, el método comprende además, o alternativamente consiste esencialmente en, o además consiste en administrar una cantidad efectiva de la terapia con CAR al paciente que se determina que es probable que responda a la terapia con CAR. La terapia CAR puede ser autóloga o alogénica para el paciente y el paciente puede ser sujeto que padezca un tumor sólido, animal o humano.

Las técnicas de tinción histológica para la necrosis son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, las tinciones con hematoxilina y eosina, también denominadas “tinción H y E”, son una técnica común para identificar la presencia de necrosis en los tejidos, especialmente en el crecimiento tumorigénico o canceroso. La tinción citoplásmica con H y E demuestra un aumento de la eosinofilia, atribuible en parte a la pérdida de ARN citoplasmático y en parte a proteínas citoplasmáticas desnaturalizadas. En las manchas de tejido necrótico, el citoplasma a menudo parece “apolillado” debido a la digestión enzimática de los orgánulos citoplasmáticos. Las cifras de mielina, la calcificación y la evidencia de fagocitosis en otras células también son características de los tejidos necróticos que pueden detectarse mediante tinción histológica. Los tejidos necróticos también tienen características específicas en la tinción nuclear que a menudo demuestran cariólisis, picnosis y cariorrexis como resultado de la muerte celular. Utilizando microscopía y cuantificación manual o automatizada de tales marcas necróticas, se puede determinar la relevancia de la terapia con CAR. Los medios alternativos para detectar el crecimiento tumorigénico o canceroso o los tejidos necróticos en general, incluyendo, entre otros, los diagnósticos basados en biomarcadores o en imágenes, también son igualmente

relevantes para determinar si un paciente responderá a ciertos tipos de terapia con CAR, y pueden usarse en consecuencia.

Portadores

Aspectos adicionales de la descripción se relacionan con composiciones que comprenden, o alternativamente consisten esencialmente en, o aún más consisten en, un portador y uno o más de los productos, por ejemplo, un CAR, una célula aislada que comprende un CAR, un ácido nucleico aislado, un vector, una célula aislada que contiene el CAR y el anticuerpo biespecífico descrito en la presente y/o ácidos nucleicos que codifican los anteriores; descrito en las modalidades descritas en la presente. En aspectos adicionales, la composición puede comprender adicionalmente una molécula inmunorreguladora y/o un ácido nucleico aislado que comprende un polinucleótido que codifica un anticuerpo biespecífico. En ciertas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende, o alternativamente consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en las regiones CDR relevantes de un anticuerpo contra BCMA y/o NKG2D y, opcionalmente, SLAMF7 (también conocido como CS1 o CD319), o un equivalente de cada uno de ellos. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende, o alternativamente consiste esencialmente en el mismo, o además consiste en la región variable de cadena pesada y/o cadena ligera de un anticuerpo contra NKG2D, opcionalmente, SLAMF7 (también conocido como CS1 o CD319) (que están opcionalmente optimizados por codones), y/o un equivalente de cada uno de ellos. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un fragmento variable monocatenario (scFV) derivado de un anticuerpo contra NKG2D, opcionalmente, un fragmento variable monocatenario (scFV) derivado de SLAMF7 (también conocido como CS1 de CD319) (que están opcionalmente optimizados por codones), y/o un equivalente de cada uno de ellos.

Brevemente, las composiciones farmacéuticas de la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de las composiciones reivindicadas como se describe en la presente, en combinación con uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéutica o fisiológicamente aceptables. Tales composiciones pueden comprender soluciones amortiguadoras, tales como solución salina amortiguada neutra, solución salina amortiguada con fosfato y similares; carbohidratos, tales como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos, tales como glicina; antioxidantes; agentes quelantes, tales como ácido etilendiaminotetraacético ("EDTA", por sus siglas en inglés) o glutatión; adyuvantes (por ejemplo, hidróxido de aluminio); y conservadores. Las composiciones de la presente descripción pueden formularse para administración oral, intravenosa, tópica, enteral y/o parenteral. En determinadas modalidades, las composiciones de la presente descripción se formulan para administración intravenosa.

La administración de las células o composiciones puede efectuarse en una dosis, de forma continua o intermitente durante el curso del tratamiento y se proporciona una cantidad

efectiva para lograr el beneficio terapéutico deseado. Los expertos en la técnica conocen métodos para determinar los medios y la dosis de administración más efectivos y variarán con la composición utilizada para la terapia, el propósito de la terapia y el sujeto que se esté tratando. Pueden realizarse administraciones únicas o múltiples con el nivel de dosis y el patrón seleccionados por el médico tratante. Las formulaciones de dosificación adecuadas y los métodos de administración de los agentes se conocen en la técnica. En un aspecto adicional, las células y la composición de la descripción se pueden administrar en combinación con otros tratamientos.

Las células y poblaciones de células se administran al huésped usando métodos conocidos en la técnica y descritos, por ejemplo, en PCT/US2011/064191. Esta administración de las células o composiciones de la descripción se puede realizar para generar un modelo animal de la enfermedad, trastorno o afección deseados para ensayos experimentales y de cribado.

Terapias de combinación

Las composiciones como se describen en la presente se pueden administrar como terapia de primera línea, segunda línea, tercera línea, cuarta línea u otra terapia y se pueden combinar con intervenciones citorreductoras. Se puede administrar de forma secuencial o simultánea según lo determine el médico tratante. En un aspecto, pueden combinarse con terapias que pueden regular positivamente la expresión de un tumor u otro antígeno al que se une el CAR y/o BsAb. En un aspecto, algunos fármacos clínicos pueden aumentar los antígenos dirigidos. Por ejemplo, la expresión de la superficie de CS1 puede aumentarse con lenalidomida, un fármaco inmunomodulador para el mieloma múltiple que está aprobado por la FDA, ver Wang et al. (2018) Clin. Cancer Res. 1 de enero; 24(1):106-119. Otro ejemplo es el fármaco midostaurina aprobado por la FDA que aumenta la expresión de tirosina cinasa similar a FMS 3 ("FLT3", por sus siglas en inglés) cuando el CAR-BsAb se dirige a un antígeno FLT3.

Kits

Como se establece en la presente, la presente descripción proporciona métodos para producir y administrar células CAR y/o BsAb CAR. En un aspecto particular, la presente descripción proporciona kits para realizar estos métodos, así como instrucciones para llevar a cabo los métodos de la presente descripción, tal como recolectar células y/o tejidos, y/o realizar el cribado/transducción/etc., y/o analizar los resultados.

En un aspecto, el kit comprende, o alternatively consiste esencialmente en, o además consiste en, cualquiera de los ácidos nucleicos aislados descritos en la presente y/o un vector que comprende dicho ácido nucleico y/o células alogénicas aisladas, preferiblemente células T o células NK, e/o instrucciones sobre la obtención de células autólogas de un paciente. Dicho kit también puede comprender, o alternatively consistir esencialmente en, o además comprender, medios y otros reactivos apropiados para la transducción y/o selección y/o

activación y/o expansión de células que expresan CAR y/o BsAb CAR, tales como aquellas descritas en la presente.

En un aspecto, el kit comprende, o alternativamente consiste esencialmente en, o además consiste en, una célula que expresa CAR y/o CAR-BsAb aislada o una población de la misma. En algunas modalidades, las células de este kit pueden requerir activación y/o expansión antes de la administración a un sujeto que lo necesite. En modalidades adicionales, el kit puede comprender además, o consistir esencialmente en los mismos, medios y reactivos, tales como los cubiertos en la descripción anterior, para activar y/o expandir la célula aislada que expresa CAR y/o BsAb CAR. En algunas modalidades, la célula se utilizará para terapia con CAR. En modalidades adicionales, el kit comprende instrucciones sobre la administración de la célula aislada a un paciente que necesita terapia con CAR.

Los kits de esta descripción también pueden comprender, por ejemplo, un agente amortiguador, un conservador o un agente estabilizador de proteínas. Los kits pueden comprender además componentes necesarios para detectar el marcador detectable, por ejemplo, una enzima o un sustrato. Los kits también pueden contener una muestra de control o una serie de muestras de control, que se pueden analizar y comparar con la muestra de prueba. Cada componente de un kit puede incluirse dentro de un recipiente individual y todos los diversos recipientes pueden estar dentro de un solo paquete, junto con las instrucciones para interpretar los resultados de los ensayos realizados con el kit. Los kits de la presente descripción pueden contener un producto escrito sobre o en el recipiente del kit. El producto escrito describe cómo utilizar los reactivos contenidos en el kit.

Según sea conveniente, estos componentes del kit sugeridos se pueden empaquetar de la manera habitual para su uso por los expertos en la técnica. Por ejemplo, estos componentes del kit sugeridos pueden proporcionarse en solución o como una dispersión líquida o similar.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de procedimientos que pueden usarse en varios casos para llevar a cabo la descripción.

EJEMPLO 1 - Generación y eficacia de células T BsAb CAR

Las células T del receptor de antígeno quimérico (CAR) y los anticuerpos biespecíficos (BsAb) son terapias aprobadas por la FDA y muestran un potencial curativo impresionante para el cáncer. Sin embargo, en la mayoría de los casos, ninguno ha demostrado ser curativo. Esto podría deberse en parte a la duración de las terapias, es decir, las células T con CAR pueden no sobrevivir lo suficiente *in vivo*, y el BsAb tiene una vida media muy corta con un proceso de fabricación costoso y lento, lo que limita su eficacia y amplia aplicación. Aquí, los solicitantes crearon con éxito una plataforma para combinar la terapia con células T con CAR con la terapia con BsAb, las cuales tienen potencial para efectos duraderos. Los solicitantes probaron esta plataforma en el contexto del mieloma múltiple (MM), un cáncer incurable con altas tasas de recidiva después de las terapias aprobadas actualmente por la FDA. Los solicitantes validaron

el concepto utilizando dos antígenos objetivo de MM, CS1 y BCMA, y crearon una construcción lentiviral única novedosa y eficaz para generar células T BsAb-CAR que expresan un CAR de BCMA y que secretan un BsAb anti-NKG2D-anti-CS1 soluble, en donde el primero ataca las células tumorales BCMA(+) de MM y el segundo ataca todas las células citolíticas NKG2D(+), incluyendo las células T CD8(+), las células T $\gamma\delta$, las células T citolíticas naturales (NK) y las células NK, con el fin de promover su actividad de citotoxicidad contra CS1(+) MM. Esta modalidad inmune multifacética, todo en uno, proporciona dos “fármacos vivos” simultáneamente, es decir, células T con CAR y BsAb, que capturan células efectoras inmunes tanto innatas como adaptativas dirigidas a diferentes antígenos objetivo en la misma población maligna. Los solicitantes encontraron que, en comparación con las células T BCMA CAR o las células T transducidas con BsAb, las células T BsAb-CAR secretaban más IFN- γ y mostraban una mayor capacidad de desgranulación, al tiempo que mostraban una mayor citotoxicidad *in vitro* al dirigirse a las células tumorales MM, incluyendo las líneas celulares MM y células tumorales de MM primarias. La expresión forzada ectópicamente de BCMA y CS1 en células objetivo que carecen de expresión endógena de estos dos antígenos potenció la lisis de las células objetivo. Es importante destacar que, el BsAb anti-NKG2D-anti-CS1 secretado de las células T BCMA CAR actúa de forma autocrina para desencadenar la proliferación de células T BCMA CAR *in vitro*, así como su proliferación y supervivencia mejoradas *in vivo*, respectivamente, a través de la activación de la señalización de NKG2D. Estos efectos de múltiples frentes dieron como resultado una fuerte actividad antitumoral *in vivo*. En conjunto, en la presente se proporciona evidencia para generar inmunoterapia contra el cáncer de nueva generación, con la capacidad de combinar la terapia con células T con CAR y la terapia con anticuerpos biespecíficos anti-NKG2D en una única plataforma para una mayor duración y eficacia mejorada, así como la capacidad de capturar actividad anti-tumoral de células efectoras citolíticas tanto innatas como adaptativas.

Cultivo celular: Las líneas celulares MM.1S, H929, RPMI-8226 (líneas celulares de mieloma múltiple humano) y K562 (línea celular eritroleucémica humana) se adquirieron de la ATCC (Manassas, VA, EE.UU.). Estas células se cultivaron con medio Roswell Park Memorial Institute (“RPMI”, por sus siglas en inglés) 1640 (Sigma, St. Louis, EE.UU.) que contenía suero bovino fetal (“FBS”, por sus siglas en inglés) al 10% (Invitrogen, CA, EE.UU.) y antibiótico-antimicótico al 1% (Invitrogen). La línea celular 293T, que se compró de ATCC y se usó para la producción de lentivirales, se cultivó en medio de Eagle modificado de Dulbecco (“DMEM”, por sus siglas en inglés) (Sigma) más los mismos suplementos que en RPMI 1640. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) de donantes sanos y pacientes con MM mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se aislaron células NK CD56⁺ humanas, células NKT CD3⁺CD56⁺ y células T CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺ utilizando kits de

aislamiento de células NK, NKT y T $\gamma\delta$ humanas (MACS, Miltenyi Biotech, Auburn, CA, EE.UU.), respectivamente, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras primarias de pacientes con MM fueron proporcionadas por el Recurso Compartido del Banco de Tejidos de Leucemia del OSU Comprehensive Cancer Center y James Cancer Hospital. Todo el trabajo con sujetos humanos se realizó de acuerdo con un protocolo aprobado por la Junta de Revisión Institucional de la Universidad Estatal de Ohio.

Ratones: Se adquirieron ratones NSG (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ) de seis a 8 semanas de edad de Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, EE.UU.) y se utilizaron para todos los estudios *in vivo*. Todo el trabajo con animales se realizó de acuerdo con un protocolo aprobado por el Comité de Uso y Cuidado de Animales de la Universidad Estatal de Ohio. La progresión de la enfermedad MM se controló de cerca y se registraron los datos de supervivencia. Los ratones se sacrificaron tras la observación de parálisis de las patas traseras, letargo y pérdida de peso evidente.

Generación de construcciones antivirales BCMA-CAR, BsAb anti-NKG2D-anti-CS1 y BsAb-BCMA CAR: Para BCMA CAR, las secuencias del dominio de codificación de BCMA para las regiones variables de cadenas pesadas (VH) y ligeras (VL) se derivaron de un hibridoma y se recombinaron usando un enlazador. El fragmento VH-enlazador-VL se incorporó en el marco con la porción CD28-CD3zeta. El fragmento anti-BCMA-scFv-CD28-CD3zeta se subclonó en el vector lentiviral pCDH para crear una construcción pCDH-BCMA CAR de segunda generación. Para preparar la construcción lentiviral de BsAb anti-NKG2D-anti-CS1, dos fragmentos variables monocatenarios (scFv) optimizados por codones de un anticuerpo monoclonal²⁹ anti-CS1 y un anticuerpo anti-NKG2D unidos por un enlazador proteico no inmunogénico derivado aldosa³⁵ del músculo humano se clonaron en el vector lentiviral pCDH. Para el BsAb -BCMA CAR “todo en uno”, el casete anti-BCMA-scFv-CD28-CD3 ζ -T2A se incorporó al pCDH BsAb-EF1a-GFP anti-CS1-NKG2D para construir una construcción lentiviral pCDH-BCMA CAR-T2A-BsAb-EF1a-GFP completa.

Producción y transducción letiviral de células T: La transfección e infección lentivirales se realizaron como se describe en un protocolo previamente informado^{36,37}.

Generación de células K562 que expresan de manera estable los genes CS1 y BCMA: La construcción pCDH-CMV-CS1-EF1 α -GFP de longitud completa que contiene secuencias de codificación de CS1 humana se informó previamente³⁰. Para producir lentivirus, se cotransfectaron células 293T con el plásmido pCDH-CS1 o un plásmido de vector vacío pCDH más los plásmidos de empaquetamiento pCMV-VSVG y pCMV- δ r9 usando lipofectamina® 2000 (Invitrogen). A continuación, se recolectaron los sobrenadantes lentivirales y se usaron para infectar células K562 usando un protocolo previamente publicado^{36,38}. Las células positivas para GFP se clasificaron posteriormente usando un clasificador de células FACS Aria II (BD Biosciences, San José, CA, EE.UU.). BCMA-K562 son células K562

transducidas con un vector que lleva el ADNc de BCMA de longitud completa. La producción, infección y clasificación de lentivirus se realizaron utilizando los métodos descritos anteriormente. Se generaron células CS1⁺BCMA⁺K562 transduciendo una construcción lentiviral pCDH-CMV-BCMA-EF1 α -GFP a células CS1-K562 descritas anteriormente. Las células de doble transducción se tiñeron con un mAb APC-anti-BCMA y posteriormente se clasificaron para la población GFP⁺BCMA⁺. Antes de usarse para experimentos, estas células doble positivas GFP⁺BCMA⁺ se pasaron varias veces en cultivo para asegurar la pérdida de células unidas a mAb anti-BCMA.

Análisis de citometría de flujo: La detección de la expresión de CAR en la superficie celular se realizó como se informó anteriormente ³⁰. Los anticuerpos utilizados en este estudio incluyen: FITC y anticuerpo policlonal (Fab)₂ de cabra anti-ratón etiquetado con biotina o anticuerpo policlonal de inmunoglobulina G (IgG) de cabra normal (Jackson ImmunoResearch), estreptavidina conjugada con alofococianina (APC) (Jackson ImmunoResearch), estreptavidina conjugada con PerCP/Cy5.5 (Biolegend), PE, PerCP/Cy5.5 y BV421 anti-CD3 humano (hCD3, clon UCHT1 y SK7, BD Biosciences), APC y PE anti-hCD56 (clon TULY56 y CMSSB, eBioscience), FITC y PC5.5 anti-TCR pan γ/δ (clon IMMU510, Beckman Coulter, Inc. CA, EE.UU.), PC5 anti-TCR pan $\alpha\beta$ (clon IP26A, Beckman), FITC anti-TCR V γ 9 (clon IMMU 360, Beckman) y Pacific Blue anti-TCR V δ 2 (clon IMMU 389, Beckman), no conjugado y APC-anti hNKG2D (clon 1D11BD Biosciences), PE-Cy7 anti-hCD8 (clon SK1, BD Biosciences), APC-Cy7 anti-hCD4 (clon SK3, BD Biosciences), BV421 anti-CD1d humano (clon CD1d42, BD OptiBuild), V450 anti-hCD11c (clon B-ly6, BD Horizon), APC-H7 anti-hCD19 (clon HIB19, BD Pharmingen), APC-H7 anti-hCD20 (clon 2H7, BD Biosciences), FITC anti-hCD45 (clon J.33, Beckman), biotina y FITC anti-hCD14 (clon 63D3 y M5E2, Biolegend), biotina y PE anti-hCD33 (clon P67.6, Biolegend y WM53, BD Pharmingen), biotina anti-hCD66b (clon G10F5, Biolegend), no conjugado y PE-anti hCS1 (clon 162, eBioscience), APC-anti hBCMA (clon 19F2, Biolegend), PE-anti Ki67 (clon SolA15, BD Biosciences), PE-hCD69 (clon FN50, BD Biosciences). Las células se lavaron una vez con PBS que contenía albúmina de suero bovino al 4%, se tiñeron con anticuerpos durante 20 min a temperatura ambiente y se analizaron con un citómetro de flujo LSRII (BD Biosciences, San José, CA, EE.UU.).

Inmunotransferencia: Para detectar la expresión y secreción intracelular del anticuerpo biespecífico, se recolectaron células T transducidas con BsAb o células T BsAb-CAR y sobrenadantes libres de células del cultivo de estas células para inmunotransferencia utilizando mAb con etiqueta 6x-his (clon 4A12E4, Invitrogen). La inmunotransferencia se realizó de acuerdo con un protocolo de inmunotransferencia estándar que los solicitantes informaron previamente ^{30,37}. Para la detección de la expresión de CAR, se lisaron células T transducidas con CAR y se extrajeron las proteínas para la inmunotransferencia, sondadas con mAb anti-CD3 ζ humano de ratón (BD Pharmingen), como se informó anteriormente ^{30,37}.

- Ensayo de citotoxicidad:** las células se etiquetaron con ^{51}Cr y se cocultivaron con células T transducidas en diversas proporciones efector: objetivo (E:T) en los pocillos de placas de fondo en V de 96 pocillos a 37°C durante 4 h, seguido de la recolección de sobrenadantes para medir la liberación de ^{51}Cr de las células objetivo utilizando el contador TopCount (Canberra Packard). Al estudiar la capacidad de BsAb para activar PBMC, se aislaron células T CD3^{+} , células T citotóxicas CD8^{+} , células T $\gamma\delta$, células NKT y células NK de leucopacks pedidos a la Cruz Roja Americana. Las células T se cebaron con perlas DynabeadsTM de activador de T humano CD3/CD28 ($4 \times 10^4/\mu\text{l}$, Perlas:T = 1:1) con IL-2 (500 U/ml) e IL-15 (500 U/ml) durante 5-14 días antes del ensayo estándar de liberación de ^{51}Cr de 4 horas descrito anteriormente.
- 10 Las células NK humanas se activaron con IL-2 (500 U/ml) antes del ensayo de citotoxicidad. Se activaron células NKT $\text{CD3}^{+}\text{CD56}^{+}$ humanas aisladas mediante α -GalCer (α -Galactosilceramida, KRN7000, Enzo Biochem Inc. NY, EE.UU.). 100 ng/ml) con IL-2 (100 U/ml) ³⁹ durante 7-10 días. Para la activación de células T $\text{CD3}^{+}\gamma\delta\text{TCR}^{+}$, se utilizó HMBPP ((E)-1-Hidroxi-2-metil-2-butenil 4-pirofosfato, Sigma. 10 nM) con IL-2 (100 U/ml) ^{40,41} y se cultivaron
- 15 durante 14 días. El protocolo para el aislamiento de estas células de leucopacks fue aprobado por la Junta de Revisión Institucional de la Universidad Estatal de Ohio.

- ELISA:** La presencia de IFN- γ humano en los sobrenadantes de cultivo se analizó mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) usando un kit de R&D Systems (Minneapolis, MN, EE.UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los niveles de
- 20 IL-2 y TNF- α humanos en los sobrenadantes de cultivo también se analizaron mediante kits de ELISA (Thermo Fisher Scientific, MA, EE.UU.). Para estos análisis de ELISA, se incubaron 2.5×10^5 células de una línea celular de mieloma o células MM primarias de pacientes con 2.5×10^5 células T de control o modificadas genéticamente en placas de fondo en V de 96 pocillos durante 24 h. Los datos se leyeron a 450 nm usando un lector de microplacas Synergy HT
- 25 (Biotek, Winooski, VT, EE.UU.).

- Tratamiento *in vivo* de ratones portadores de MM e imagenología de bioluminiscencia:** Las células de mieloma MM.1S que expresan un gen de luciferasa de luciérnaga, MM.1S-GL3, se han descrito previamente³⁰. Para construir un modelo de MM ortotópico de xenoinjerto, se inyectaron ratones NSG (machos) con 8×10^6 células MM.1S-GL3
- 30 en 200 μl de solución salina a través de la vena de la cola i.v. el día 0. En los días 10, 17 y 24, a los ratones se les administraron (1) control de vehículo (solución salina) o 10×10^6 células efectoras, incluyendo (2) células T transducidas con vector vacío, (3) células T transducidas con BsAb, (4) células T transducidas con BCMA-CAR, (5) células T transducidas secuencialmente con BsAb y BCMA-CAR, o (6) células T transducidas con BsAb-CAR, mediante inyección i.v.
- 35 en la vena de la cola, cada una en 200 μl de solución salina. Diez días, 24 días, 31 días después de la inoculación con células MM.1S-GL3, se inyectó intraperitonealmente D-luciferina (150 mg/kg de peso corporal; Gold Biotechnology) a todos los ratones. La imagenología se realizó

utilizando el sistema de imágenes In Vivo (“IVIS”, por sus siglas en inglés) con el software Living Image (PerkinElmer). El día 80, los ratones supervivientes se sometieron a exposición mediante una inyección i.v. en la vena de la cola de 4×10^6 células MM1.S por ratón en una línea de 200 μ l. Los datos de supervivencia se recolectaron y cerraron el día 140. Para investigar el efecto de BsAb, se repitió el experimento anterior en presencia de PBMC con agotamiento de células mieloides humanas. Para este propósito, los ratones NSG se inyectaron i.v. con 8×10^6 células MM.1S-GL3 en 200 ml de solución salina a través de la vena de la cola el día 0. El día 10, a los ratones se les administraron 3×10^6 células T transducidas diversas seguidas de PBMCs humanas 3×10^6 CD33⁺CD14⁺CD66b⁺, todas i.v. Los días 17 y 24, los ratones recibieron 3×10^6 células T modificadas i.v. generadas del mismo donante. El día 10, el día 19, el día 28 y el día 37, los ratones se infundieron con D-luciferina y se sometieron a imagenología como se describió anteriormente.

Inmuno-sinapsis detectada por microscopía de inmunofluorescencia:

Principalmente para marcar el BsAb anti-NKG2D-anti-CS1 secretado, se recolectó el sobrenadante de las células T BsAb CAR y se tiñeron con mAb de etiqueta 6x-His (clon 4E3D10H2/E3, Invitrogen) a una dilución de 1:500 durante 1 h en incubación a 37°C y posteriormente se etiquetaron con Alexa Fluor®350 (azul, Thermo Fisher Scientific, MA, EE.UU.). Las células MM.1S se recolectaron y se incubaron durante 45 min en condiciones de crecimiento con colorante rojo profundo CellTracker™ (20 μ M, Thermo Fisher Scientific). Para ver la sinapsis inmune, se cultivaron conjuntamente células T BsAb-CAR (GFP, verde) o células T de control transducidas con vector vacío (GFP, verde) con células MM.1S (rojo) y sobrenadante marcado con etiqueta His durante 1 h o 24 h. Se observaron imágenes de fluorescencia de células vivas mediante sistemas de microscopios Zeiss (Zeiss Axio Observer Z1, Carl Zeiss Inc., NY, EE.UU.). Para la filmación de video, se cocultivaron células T BsAb-CAR (GFP, verde) o células T transducidas con vector vacío (GFP, verde) con células MM.1S (rojo) durante 1 h, y se utilizó microscopía para observar la inmunosinapsis durante un período de 2 h.

Resultados: *Generación de células T primarias que expresan CAR específico de BCMA y/o el anticuerpo biespecífico anti-NKG2D-anti-CS1:* Los solicitantes generaron una construcción BCMA-CAR específica con un esqueleto de vector lentiviral, que consiste secuencialmente en un péptido señal (“SP”, por sus siglas en inglés), una región variable de cadena pesada (VH), un enlazador de glicina-serina (GS), una región variable de cadena ligera (VL), una etiqueta Myc, una bisagra, CD28 y CD3 ζ (Figura 1A). A continuación, los solicitantes diseñaron la construcción del anticuerpo biespecífico anti-NKG2D-anti-CS1 (denominado “BsAb”) con una estructura de vector lentiviral. Consistía en dos fragmentos variables monocatenarios (scFv) optimizados por codones de un anticuerpo anti-NKG2D y un anticuerpo monoclonal anti-CS1, unidos por una proteína enlazadora no inmunogénica derivada de la

aldosa de músculo humano. Cada scFv contiene una cadena pesada (VH) y una cadena ligera (VL) correspondientes conectadas por un enlazador de glicina-serina (GS) (Figura 1B). Las mismas células T de donante aisladas a partir de un donante sano y activadas por perlas de anticuerpo CD3/CD28 anti-humano fueron transducidas con el vector vacío (EV), la construcción de BsAb, la construcción de BCMA-CAR, o se transdujeron primero con la construcción de BsAb seguido secuencialmente mediante transducción con la construcción de BCMA-CAR (en lo sucesivo, la construcción de T trans. sec. BsAb-BCMA). La expresión de BCMA CAR en la superficie celular se demostró mediante la tinción de células T transducidas con anti-Fab, que detectó la expresión de scFv en más del 80% de las células T enriquecidas con FACS transducidas con la construcción de BCMA CAR o con la construcción de células T trans. sec. BsAb-BCMA, mientras que la expresión permaneció casi indetectable en células T no modificadas, en células T transducidas con EV y en células T BsAb (Figura 1C). Para determinar si las células T BsAb y las células T trans. sec. BsAb-BCMA se transdujeron con éxito, se recolectaron los sobrenadantes libres de células de un cultivo de 4 días y se lisaron los sedimentos celulares de un cultivo de 4 días. A continuación, tanto los sobrenadantes como los lisados celulares se sometieron a inmunotransferencia usando un Ab con etiqueta 6x-his. Los resultados mostraron que las células T BsAb, así como las células T trans. sec. BsAb-BCMA produjeron BsAb tanto celular como secretado, mientras que los controles de sobrenadantes y lisados de células T no modificadas no produjeron BsAb (Figura 1D).

Las células T trans. sec. BsAb-BCMA son asesinas de MM más eficaces que las células T transducidas con cada vector solo in vitro: Dado que el BsAb contenía una parte del receptor anti-NKG2D y una parte anti-CS1, los solicitantes intentaron desencadenar la activación de NKG2D en las células inmunes citolíticas NKG2D⁺ y probaron si activaba simultáneamente las células MM a través del antígeno asociado a MM, CS1. Los solicitantes evaluaron en primer lugar la expresión superficial de CS1 y BCMA en tres líneas celulares MM de uso común MM.1S, H929, RPMI-8226 y una línea celular eritroleucémica humana, K562, mediante análisis de citometría de flujo. Los resultados mostraron niveles variados de expresión de BCMA y CS1 en las cuatro líneas celulares MM. La línea celular MM1.S MM tiene altos niveles de expresión tanto de BCMA como de CS1; la línea celular H929 MM tiene altos niveles de BCMA y niveles intermedios (int) de expresión de CS1; y la línea celular RPMI-8226 MM tiene niveles intermedios de expresión de BCMA, mientras que su expresión de CS1 es muy baja. Como control negativo, la línea celular de eritroleucemia K562 no expresó CS1 ni BCMA en la superficie celular (Figura 2A). Para determinar si células T trans. sec. BsAb-BCMA (con CAR transducido secuencialmente con BCMA y BsAb anti-NKG2D-anti-CS1) podrían conducir a la lisis de células tumorales más eficiente de las líneas celulares de MM, se realizó un ensayo de liberación de ⁵¹Cr estándar de 4 horas, utilizando la línea celular K562 de eritroleucemia como control objetivo negativo. Antes de generar una célula T BsAb-CAR modificada por construcción

única, los solicitantes compararon la muerte de células tumorales MM en cinco grupos de células T: (1) células T no modificadas, (2) células T transducidas por vector vacío (EV) (T EV), (3) células T transducidas con BsAb anti-NKG2D-anti-CS1 (en lo sucesivo denominadas T BsAb), (4) células T transducidas con BCMA-CAR (en lo sucesivo denominadas T BCMA-CAR), y (5) células T transducidas secuencialmente con BCMA-CAR y BsAb anti-NKG2D-anti-CS1 (denominadas T trans. sec. BsAb-BCMA). Para las líneas celulares de MM objetivo BCMA^{alto}CS1^{alto} MM.1S y BCMA^{alto}CS1^{int} H929, las células T trans. sec. BsAb-BCMA produjeron una destrucción significativamente mejor que las células T BsAb o las células T BCMA-CAR. Para la línea celular objetivo MM BCMA^{int}CS1^{bajo} RPMI-8226, las células T trans. sec. BsAb-BCMA se comportaron mejor que las células T BsAb, pero no mejor que las células T BCMA-CAR; Es importante destacar que el direccionamiento del antígeno único o combinado no tuvo actividad contra la línea celular objetivo eritroleucémica K562 de control negativo (Figura 2B). Cabe destacar que las células T BCMA-CAR fueron más eficaces en la lisis de células objetivo MM en comparación con los efectos de las células T BsAb, las células T EV y las células T no modificadas. El análisis estadístico indicó que se observaron efectos sinérgicos para los ensayos de citotoxicidad realizados con la población de células T trans. sec. BsAb-BCMA de células efectoras cuando las líneas celulares MM objetivo expresaron niveles medios a altos de CS1 y BCMA (es decir, MM1.S y H929), mientras que este efecto no se observó cuando las células objetivo expresaron niveles bajos o medios de los dos antígenos (es decir, RPMI-8226) (Figura 2B).

Para determinar aún más la activación de las células T transducidas anteriores tras el reconocimiento de células MM que expresan de forma endógena CS1 y BCMA, los solicitantes midieron la secreción de IFN- γ , IL-2 y TNF- α mediante ELISA en sobrenadantes de células T no modificadas, células T EV, células T BCMA-CAR, células T BsAb, y células T trans. sec. BsAb-BCMA. La secreción de IFN- γ de células T trans. sec. BsAb-BCMA fue significativamente más alta que las células T BsAb o las células T BCMA CAR solas cuando se cultivaron conjuntamente con líneas celulares BCMA^{alto}CS1^{alto} MM.1S o BCMA^{alto}CS1^{int} H929 MM. En las condiciones de cultivo conjunto con la línea celular BCMA^{int}CS1^{bajo} RPMI-8226 MM, la secreción de IFN- γ de células T trans. sec. BsAb-BCMA fue significativamente más alta que las células T BsAb, pero no significativamente más alta que las células T BCMA. En la condición de cocultivo con la línea celular de eritroleucemia CS1⁻BCMA⁻ K562 o sin células objetivo tumorales, las células T trans. sec. BsAb-BCMA no fueron superiores al direccionamiento de un único antígeno con células T BsAb o células T BCMA-CAR (Figura 2C). La producción de IL-2 en células T BsAb, células T BCMA-CAR o células T trans. sec. BsAb-BCMA fue dramáticamente más alta que las células T sin modificar o las células T EV cuando se cultivaron conjuntamente con líneas celulares MM.1S, H929 o RPMI-8226 MM (Figura 2D). Curiosamente, incluso en cocultivos con la línea celular de eritroleucemia K562 de control negativo o sin células objetivo, las células T

BsAb y células T trans. sec. BsAb-BCMA secretaron un alto nivel de IL-2 que fue significativamente mayor que la secreción de IL-2 observada en las células T BCMA CAR (Figura 2D), lo que sugiere que, al menos en este caso, el efecto parece resultar de la presencia del propio BsAb secretado, en lugar de las células objetivo MM. La secreción de TNF- α fue consistente con la secreción de IFN- γ (Figura 2E). En general, estos resultados indicaron que, en comparación con las células T BsAb o las células T BCMA-CAR, las células T trans. sec. BsAb-BCMA pueden reconocer más específicamente las células objetivo MM y activarse más después del reconocimiento de estas células MM. Por otra parte, en comparación con otras condiciones, los solicitantes también observaron que el BsAb secretado a partir de células T BsAb o células T trans. sec. BsAb-BCMA parecía desencadenar la activación de las células T independientemente de la presencia o ausencia de células MM, como lo demuestra su producción de IL-2 muy abundante en comparación con las células T que no expresan la construcción de BsAb (Figura 2D). Esto sugirió que el receptor NKG2D expresado en células T CD8(+) citotóxicas estaba siendo activado por la presencia del BsAb secretado.

Generación de células T BsAb-CAR de construcción única para dirigirse a BCMA y CS1 en MM: Los solicitantes señalaron que las células T que coexpresan BCMA-CAR y BsAb anti-NKG2D-anti-CS1 administradas por dos construcciones separadas (es decir, células T trans. sec. BsAb-BCMA) fueron superiores para eliminar células MM en comparación con las células T que expresan BCMA-CAR o BsAb. Una única construcción que expresa tanto un BsAb como un CAR (denominada en lo sucesivo BsAb-CAR) sería más práctico para (1) producir una expresión efectiva de ambas construcciones en una única célula T; (2) disminuir de los costos de fabricación; y (3) ahorrar tiempo. Por lo tanto, los solicitantes generaron una única construcción BsAb-CAR que contiene ambas partes en una estructura de vector lentiviral conectada por T2A (Figura 3A). Para generar células T primarias que expresan BsAb-CAR, los solicitantes utilizaron el mismo método descrito anteriormente y posteriormente determinaron si las células T transducidas con BsAb-CAR se transdujeron con éxito. La expresión superficial del CAR se confirmó mediante análisis de citometría de flujo (Figura 21C). La proteína de fusión de BsAb se detectó con éxito usando un Ab con etiqueta 6x-his en el día 4 en ambos lisados celulares y en el medio sin suero (Figura 3B). Además, para medir dinámicamente la secreción de BsAb, los solicitantes volvieron a sembrar las células T BsAb-CAR en medio sin suero el día 5, y posteriormente recolectaron los sobrenadantes libres de células a las 12 h, 24 h, 48 h, 72 h y 96 h. Los resultados mostraron que la secreción de BsAb era potente, ya que la expresión comenzó antes de las 12 h y continuó aumentando de manera dependiente del tiempo (Figura 21A y Figura 21B). Los solicitantes demostraron entonces que las células T BsAb-CAR no fraccionadas mostraban una destrucción significativamente superior de la línea celular MM.1S BCMA^{alto}CS1^{alto} MM en comparación con la destrucción por células T EV y células T no modificadas (Figura 3C). Se obtuvieron resultados similares contra las líneas celulares objetivo

BCMA^{alto}CS1^{int} H929 y BCMA^{int}CS1^{bajo} RPMI-8226 MM, mientras que no hubo destrucción contra la línea celular de eritroleucemia K562 de control negativo (Figura 21D). Como aproximadamente el 80% de las células T CD8⁺ tienen una expresión de alta densidad superficial de NKG2D (frente al 30% de las células T no fraccionadas; Figura 11A), los solicitantes transdujeron a células T CD8⁺ altamente enriquecidas con la construcción de BsAb-CAR. Tal vez como era de esperar, los solicitantes encontraron que estas células tienen una mayor citotoxicidad que las células T BsAb CD8⁺ y las células T BCMA-CAR CD8⁺, así como más alta que dos controles negativos, células T no modificadas y células T EV, contra la línea celular BCMA^{alto}CS1^{alto} MM.1S MM (Figura 3D).

El BsAb secretado por las células T con CAR requiere dos antígenos para ser funcional: CS1 expresado en células tumorales y NKG2D expresado en células inmunes. Los solicitantes evaluaron primero los porcentajes de células T CD3⁺ TCR pan α/β , células T CD3⁺ TCR pan γ/δ , NKT CD3⁺CD56⁺, y NK CD3⁺CD56⁺ entre PBMCs, que representan aproximadamente el 50%, 1%, 8% y 15% de PBMCs, respectivamente (Figura 11A). Además, los solicitantes confirmaron que NKG2D se expresa en aproximadamente el 30% de las células T, el 80% de las células T CD8⁺, el 70% de las células T $\gamma\delta$, el 60% de las células NKT y el 90% de las células NK. Cabe destacar que casi el 90% de las células T V γ 9V δ 2, que son un subconjunto de las células T $\gamma\delta$, expresaron NKG2D (Figura 11B y Figura 11C). Para determinar si el BsAb anti-NKG2D-anti-CS1 desencadena células inmunes NKG2D⁺, los solicitantes llevaron a cabo ensayos de liberación de cromo-⁵¹ de 4 horas como se describió anteriormente en la proporción de 10 células efectoras (células T transducidas o no modificadas) a 1 célula objetivo (MM.1S), pero añadieron diferentes cantidades de PBMCs humanas, es decir, 1, 10, 100 o 200 veces de células tumorales. Los solicitantes plantearon la hipótesis de que si el BsAb secretado por las células T BsAb y/o las células T BsAb-CAR estuvieran reclutando células efectoras citolíticas NKG2D⁺ no transducidas en la línea celular CS1⁺ MM objetivo, la destrucción del objetivo aumentaría con una mayor dilución a partir de la adición de PBMCs no transducidas. En apoyo de su hipótesis, a medida que aumentaron las PBMCs no transducidas, sólo los cultivos que contenían células T transducidas que secretaban BsAb (es decir, células T BsAb y células T BsAb-CAR) mostraron una citotoxicidad creciente contra la línea celular BCMA^{alto}CS1^{alto} MM.1S MM (Figura 3E). Como era de esperar, el efecto fue más modesto contra la línea celular BCMA^{alto}CS1^{int} H929 con menor expresión de CS1 que la línea celular MM.1S MM y estuvo ausente contra la línea celular objetivo BCMA^{int}CS1^{bajo} RPMI-8226 MM, Figura 12A, Figura 12B).

A continuación, los solicitantes enriquecieron cada subconjunto de PBMC, es decir, células NK, células NKT, células T CD8⁺ y células T $\gamma\delta$ 2, hasta casi un 98% de pureza (Figura 13A, Figura 13B, Figura 13C, Figura 13D), y las prepararon con IL-2, CalCer más IL-2, perlas Dynabeads CD3/CD28 más IL-2 y HMBPP más IL-2, respectivamente, y se transdujeron cada

uno con uno de los vectores de control o experimentales, seguido del ensayo de citotoxicidad de liberación de ^{51}Cr de 4 h (Figura 3F, izquierda) o 16 h (Figura 3F, derecha) contra la línea celular BCMA^{alto}CS1^{alto} MM.1S MM en una relación E:T de 5:1 para cada uno. A las cuatro o más horas de incubación, los resultados mostraron que las células T BsAb CAR tienen una citotoxicidad significativamente mayor que las células idénticas transducidas con las otras construcciones, independientemente del subconjunto de células T o del método de activación (Figura 3F, Figura 14A, Figura 14B, Figura 14C, Figura 14D y Figura 14E). Es importante destacar que entre las poblaciones de células T CAR BsAb examinadas, en comparación con las células de control, las células T BsAb CAR CD4⁺ activadas tuvieron el menor aumento en la actividad citotóxica (Figura 3F, derecha, y Figura 14A, Figura 14B, Figura 14C, Figura 14D y Figura 14E), probablemente debido al menos en parte a la relativamente baja expresión de densidad de superficie de NKG2D en esta población.

Para determinar si el BsAb secretado por células T BsAb-CAR puede inducir la formación de sinapsis entre células T BsAb-CAR y células MM MM.1S, se realizó un análisis de microscopía confocal después de una hora de coincubación. Cuando se observó un control de cocultivo de células T EV y células MM MM.1S, no se observaron sinapsis (Figura 3G). Por el contrario, se observaron sinapsis durante el cocultivo de células T BsAb-CAR y células MM.1S MM (Figuras 3H).

Además, cuando se observaron los cocultivos de 24 horas de células T BsAb CAR (verde) con las células MM.1S MM objetivo (rojo), los solicitantes notaron que sólo estaba presente la población T BsAb CAR (verde) (Figura 15A, Figura 15B, Figura 15C, Figura 15D, Figura 15E y Figura 15F); sin embargo, en el cocultivo de células T EV y células MM MM.1S, las células MM objetivo MM.1S y las células T EV efectoras (verde) todavía estaban presentes (Figura 15G, Figura 15H, Figura 15I, Figura 15J, Figura 15K, Figura 15L y Figura 15M).

El reconocimiento y la activación funcionalmente mejorados de las células T BsAb-CAR dependen de CS1 y BCMA: Para demostrar que el efecto citotóxico mejorado de las células T BsAb-CAR dependía de la orientación antígenos tumorales, a continuación los solicitantes exploraron si la sobreexpresión forzada de CS1 y BCMA en la línea celular K562 resistente a células T BsAb-CAR podría reducir su umbral para la lisis contra esta población efectora. Para este propósito, los solicitantes transdujeron secuencialmente a células K562 con lentivirus que codifican CS1 y BCMA humanos (o vector vacío PCDH como control) para generar la línea celular K562 que expresa ectópicamente CS1 y BCMA (Figura 16). Después de confirmar el éxito de la generación de la línea celular objetivo (Figura 4A), los solicitantes realizaron ensayos de liberación de ^{51}Cr y los resultados indicaron que la sobreexpresión de CS1 y BCMA en la línea celular de eritroleucemia K562 dio como resultado un aumento significativo en la actividad citotóxica de células T BsAb-CAR contra esta línea celular K562 en comparación con la citotoxicidad usando las células T EV (Figura 4B, líneas púrpuras). A continuación, los

solicitantes realizaron ensayos ELISA, que mostraron un aumento de la secreción de IFN- γ e IL-2 en cocultivos de células T BsAb-CAR y células K562-CS1-BCMA, en comparación con cocultivos de células T EV con células K562-CS1-BCMA (Figura 4C, Figura 4D). Sin embargo, no hubo diferencia en la citotoxicidad, producción de IFN- γ e IL-2 entre las células T BsAb-CAR y las células T EV cuando se incubaron con K562-PCDH (Figura 4B, Figura 4C, Figura 4D). En conjunto, estos datos sugirieron que el mayor reconocimiento, destrucción y secreción de citocinas de las células objetivo por las células T BsAb-CAR se produjo de una manera dependiente de CS1 y BCMA.

El BsAb anti-NKG2D-anti-CS1 secretado mejora la proliferación de células T con CAR in vitro y tanto la supervivencia como la proliferación in vivo a través de la señalización de NKG2D: En algunos pacientes, las células T con CAR no sobreviven mucho tiempo, debido a su capacidad de expansión y supervivencia limitada, y esto puede limitar la eficacia de estas células ⁴². Inesperadamente, los solicitantes encontraron que el medio de cultivo de células T transducidas con BsAb y células T BsAb-CAR era más acidótico en comparación con otras condiciones sin BsAb en puntos de tiempo similares, lo que sugiere una mayor tasa de metabolismo celular (Figura 5A, parte superior). Esta observación concuerda con los datos descritos anteriormente de que estas células transducidas con BsAb pueden secretar más citocinas incluso sin células objetivo o con células objetivo BCMA⁺CS1⁺ (Figura 2D). Los solicitantes especularon que la expresión y secreción del BsAb puede inducir la proliferación, supervivencia y/o activación de las células T. La enumeración celular confirmó que, en comparación con otras condiciones de cultivo, las que contenían células T transducidas con la construcción de BsAb o BsAb-CAR de hecho contenían una cantidad significativamente mayor de células (Figura 5A, gráfico de barras), que fue resultado de la proliferación de células T según lo documentado por el rastreador de células violetas y se muestra como dilución V450 mostrada en histogramas en el panel inferior (Figura 5A, histograma).

Para confirmar estos resultados inesperados, los solicitantes añadieron los sobrenadantes de cultivos de células T BsAb-CAR mostrados en la Figura 5A a condiciones de cultivo celular que eran sin BsAb, es decir, células T BCMA CAR, células T EV y células T no modificadas. De hecho, la adición de sobrenadantes de cultivos de células T BsAb-CAR dio como resultado un grado significativamente mayor de metabolismo celular después de 5 días de incubación, como lo demuestra el color amarillo del medio como ocurre en el recambio celular, en comparación con cultivos de células T BCMA CAR, células T EV y células T no modificadas que no se suplementaron con sobrenadantes de medio de células T BsAb-CAR (no mostrado). La enumeración de células confirmó que, en comparación con otras condiciones de cultivo, los que se habían complementado con medio de cultivos de células T BsAb-CAR de hecho contenían una cantidad significativamente mayor de células (Figura 5B, parte superior), que fue resultado de la proliferación de células T según lo documentado por el rastreador de

células violetas y se muestra como dilución de V450 mostrada en histogramas en el panel inferior (Figura 5B, parte inferior). La tinción de Ki67 indicó que, en los cultivos que contenían células T BsAb o células T BsAb-CAR, la gran mayoría de las células NKG2D⁺ estaban proliferando, así como casi la mitad de las células NKG2D⁻ (Figura 5C y Figura 17A), lo que indica que las células NKG2D⁺ activadas por BsAb pueden, a su vez, activar las células NKG2D⁻, aunque en menor grado. Además, el anticuerpo bloqueador de NKG2D mitigó los efectos proliferativos del BsAb secretado (marco azul de la Figura 5C, Figura 17B). Se realizó un análisis de inmunotransferencia para determinar la fosforilación ("p", por sus siglas en inglés) de la proteína AKT, confirmando que el BsAb secretado puede desencadenar la proliferación y activación de células NKG2D⁺ en condiciones de cultivo de células T BsAb y T BsAb-CAR debido a que estas condiciones tienen un mayor nivel de p-AKT (Figura 5D).

Los datos presentados hasta ahora apoyaron la idea de que la activación de las células inmunes NKG2D⁺ por el BsAb se estaba produciendo a través de la vía NKG2D. A continuación, los solicitantes preguntaron si la activación se estaba produciendo mediante de CS1, que se expresa no sólo en las células MM, sino también en las células NK, NKT, T CD8⁺ y B o sus subconjuntos. (Veillette & Guo, Crit Rev Oncol Hematol. Oct 2013;88(1):168-77. doi: 10.1016/j.critrevonc.2013.04.003. Epub 2013 Jun 2; Gogishvili et al. Blood. 28 Dic 2017;130(26):2838-2847. doi: 10.1182/blood-2017-04-778423. Epub 31 Oct 2017.) Para determinar si el BsAb secretado también estimulaba las células inmunes NKG2D⁺ mediante su expresión de CS1 y mediante la vía de señalización de CS1+, a continuación los solicitantes bloquearon esta vía utilizando un anticuerpo de bloqueo anti-CS1. Los solicitantes encontraron que el bloqueo de CS1 no afectó el estado de activación de las células inmunes (Figura 17C). Además, los solicitantes realizaron el doble bloqueo de NKG2D y CS1, y los resultados demostraron que no hubo diferencia en comparación con el bloqueo único de NKG2D (datos no mostrados). En conjunto, estos datos sugieren que la activación de las células inmunes que secretan BsAb sólo se produce a través de la vía de señalización NKG2D.

Con base en los hallazgos anteriores, los solicitantes habían anticipado que en los cocultivos de las células T con la población objetivo, las células MM.1S MM, la activación inmune no dependería estrictamente de NKG2D, ni estaría restringida al subconjunto NKG2D⁺ de células T. Por ejemplo, cuando las células T BsAb y T BsAb-CAR se cocultivaron con células MM.1S MM, tanto las fracciones NKG2D⁺ (rojo en la Figura 5E; 83% a 94%) como NKG2D⁻ (verde en la Figura 5E; 79% a 87%) de células T CD3⁺ mostraron una proliferación extensa medida por tinción con Ki67. Del mismo modo, para las células T CD3⁺ que sólo expresan BCMA CAR (indicado en la Figura 5E como Fab⁺), las fracciones NKG2D⁺ (rojo; 90.4%) y NKG2D⁻ (verde; 85.8%) de células T CD3⁺ mostraron una proliferación extensa medida por tinción con

Ki67, aunque un poco menos de lo que se observó con las células T BsAb-CAR NKG2D⁺ y NKG2D⁻.

Para investigar la capacidad de las células T transducidas para sobrevivir *in vitro*, los solicitantes cultivaron varias células T transducidas en presencia o ausencia de IL-2. En la condición de IL-2, todas las células mostraron una alta expresión de Ki67 y una baja expresión de Anexina V y/o Sytox azul (Figura 6A). Curiosamente, en la condición deficiente en IL-2 (Figura 6b), sólo las células T BsAb y las células T BsAb-CAR (que secretan BsAb y activan las células T mediante NKG2D) mostraron una mejor capacidad de proliferación como aproximadamente 80% de expresión de Ki67, que es de acuerdo con los datos presentados en la Figura 2D, y con la apoptosis y muerte celular reducida, como se ilustra por la baja expresión de la tinción de Anexina V y/o Sytox azul (Figura 6B). Estos resultados se comparan con los otros tres grupos (células T no modificadas, células T EV y células T BCMA-CAR, también en la Figura 6C). Por lo tanto, T BsAb-CAR ha mejorado la proliferación celular y aumentado la supervivencia celular, muy probablemente mediante la vía de señalización NKG2D.

Para comparar la supervivencia y proliferación de células T no modificadas, células T EV, células T BCMA CAR y células T BsAb-CAR *in vivo*, los solicitantes inyectaron (i.v.) estas células humanas en ratones NSG inmunodeficientes (Figura 7A, parte superior). La tinción de fondo antes de la inyección i.v. de las células humanas también se evaluó el día -1 (Figura 7A y Figura 18). El día +1, los ratones que recibieron cada inyección de células T humanas mostraron una expresión de CD3 humana igual, y las dos poblaciones de células T con CAR también se identificaron por su expresión de F(ab)₂. Además, el marcador de activación CD69 se detectó en el 97% de las cuatro poblaciones de células T aisladas de los ratones NSG (Figura 7A y Figura 18). Curiosamente, 14 días después de las infusiones de células T, sólo el grupo de células T BsAb-CAR retuvo su alta coexpresión de CD3 y CD69, mientras que hubo una reducción sustancial de la expresión de CD69 en los otros tres grupos (Figura 7A y Figura 18). Los análisis estadísticos indicaron que el porcentaje de día +14 de células T CD3 y CD3⁺CD69⁺ en el grupo de células T BsAb-CAR era significativamente mayor que en los otros 3 grupos (Figura 7B y Figura 7C). Treinta y cinco días después de las diversas inyecciones de células T transducidas, los histogramas mostraron que sólo los ratones inyectados con células T BsAb-CAR todavía poseían altos porcentajes de células T hCD3 (Figura 7B). Los datos de proliferación *in vivo* mostraron que el porcentaje de Ki67⁺CD69⁺ fue de aproximadamente 61.1%, que fue significativamente más alto que los otros tres grupos que recibieron células T transducidas o no transducidas (Figura 7A, paneles de corte púrpura, Figura 7C). Además, los solicitantes también determinaron la supervivencia de las células T BsAb-CAR *in vivo* y observaron que el porcentaje de células T BsAb-CAR vivas (Annexin V⁻Sytox azul⁻) era aproximadamente del 87%, y el porcentaje de células T BsAb-CAR muertas (Annexin V⁺Sytox

azul*) fue aproximadamente del 5%. Los análisis estadísticos indicaron que las células T BsAb-CAR poseían una mayor fracción de células vivas y una menor fracción de células muertas en comparación con los otros tres grupos (Figura 7D). En conjunto, las células T BsAb-CAR no sólo muestran una mayor proliferación celular mediante la vía de señalización NKG2D *in vitro*, sino que también demuestran una mayor proliferación y supervivencia *in vivo*, cuando se comparan con los otros grupos de células inyectadas (incluyendo las células T BCMA CAR).

Mejor reconocimiento y destrucción de células de mieloma primario por células T BsAb-CAR ex vivo: Para evaluar la relevancia clínica de las células T BsAb-CAR, los solicitantes investigaron si podían reconocer y destruir eficazmente las células MM aisladas de pacientes y mejorar la producción de IFN- γ *ex vivo*. Se aislaron células CD138⁺ MM primarias obtenidas de la médula ósea de ocho pacientes mediante selección magnética positiva, y se utilizó citometría de flujo para evaluar su expresión superficial de BCMA y CS1 (Figura 8A). Utilizando un ensayo de liberación de ⁵¹Cr realizado en ausencia de PBMC autólogas, los solicitantes observaron que las células MM de pacientes eran altamente resistentes a la lisis mediada por células T transducidas por EV en los ocho pacientes. En comparación con las células T BCMA CAR o las células T BsAb, las células T BsAb-CAR mostraron una citotoxicidad significativamente mayor en los ocho pacientes que se probaron, incluyendo el paciente 1 cuyas células tumorales tenían una expresión de densidad superficial muy baja de CS1. No hay una diferencia significativa en la actividad citolítica entre las células T BsAb CAR y células T trans. sec. BsAb-BCMA (Figura 8B). Los solicitantes también midieron IFN- γ después de 24 horas en un ensayo de cocultivo similar; las células T BsAb-CAR también secretaron niveles significativamente más altos de IFN- γ que las células T transducidas con EV, las células T BsAb o las células T BCMA-CAR (Figura 8C). Estos hallazgos demuestran que las células T BsAb-CAR poseen una capacidad excelente para erradicar las células MM del paciente *ex vivo*.

Las células T BsAb-CAR inhiben el crecimiento del tumor MM y prolongan la supervivencia de los ratones portadores de tumores en un modelo MM de xenoinjerto ortotópico: Para abordar aún más la posible aplicación terapéutica de las células T BsAb-CAR, los solicitantes examinaron su actividad antitumoral en un modelo de ratón NSG injertado con MM MM.1S. La inyección intravenosa de células MM.1S MM se ha utilizado ampliamente para establecer un modelo de xenoinjerto de ratón de MM, debido a que esto puede conducir a un injerto de médula ósea, así como al establecimiento consistente de lesiones líticas óseas multifocales, que recapitulan estrechamente el MM humano ^{43,44}. Para facilitar el monitoreo del crecimiento tumoral, los solicitantes diseñaron células MM.1S MM para expresar tanto GFP como luciferasa de luciérnaga mediante infección retroviral, y utilizaron inyección i.v. de 8×10^6 de estas células MM para injertar ratones NSG en el día 0 como se informó anteriormente ³⁰. A continuación, estos ratones se infundieron en tres ocasiones (día 10, día 17 y día 24) con

solución salina i.v. o 1×10^7 células T EV, 1×10^7 células T BsAb, 1×10^7 células T BCMA CAR, 1×10^7 células T trans. sec. BsAb-BCMA, o 1×10^7 células T BsAb-CAR. Para los ratones que sobrevivieron hasta el día 80, los solicitantes recolectaron linfocitos de sangre periférica y volvieron a desafiar a los ratones con 1×10^4 células MM.1S MM. Se utilizó imagenología de bioluminiscencia para controlar el crecimiento de MM.1S MM y muestra la progresión temprana de la enfermedad hasta el día 31 en los seis grupos de tratamiento (Figura 9A). Usando un anticuerpo anti-F(ab)₂ para identificar las células T BCMA CAR, los solicitantes observaron el día 80 que los porcentajes de células T trans. sec. BsAb-BCMA y las células T BsAb-CAR fueron significativamente más altas en la sangre de los ratones MM.1S MM que las T BCMA CAR (Figura 9B), mientras que el recuento total de linfocitos en cada ratón fue similar (datos no mostrados). La inmunotransferencia indicó que el suero del día 80 de los ratones MM.1S MM tratados con células T trans. sec. BsAb-BCMA o células T BsAb-CAR todavía contenían el BsAb secretado (no mostrado). Para el día 80, los ratones MM.1S MM tratados con células T trans. sec. BsAb-BCMA o con células T BsAb-CAR tuvieron una supervivencia significativamente prolongada en comparación con ratones similares tratados con control de solución salina, células T EV o células T BsAb. Los ratones MM.1S MM tratados con células T BCMA CAR obtuvieron resultados ligeramente peores que los ratones MM.1S MM tratados con células T trans. sec. BsAb-BCMA o con células T BsAb-CAR (Figura 9D). El día 140 (60 días después de la primera re-exposición al tumor), los cinco ratones MM.1S MM tratados con el grupo T BsAb-CAR sobrevivieron (Figura 9D). Estos datos de supervivencia después de una nueva re-exposición al tumor probablemente hablan de la supervivencia *in vivo* mejorada y la proliferación *in vivo* mejorada de las células T BsAb-CAR indicadas anteriormente en la Figura 7A, Figura 7B, Figura 7C y Figura 7D. En general, estos resultados indican que las células T BsAb-CAR son superiores a las otras poblaciones de células T no transducidas o transducidas en su capacidad para inhibir el crecimiento tumoral MM y prolongar la supervivencia de ratones portadores de tumores en el modelo MM de xenoinjerto ortotópico.

Para determinar la relevancia de los linfocitos NKG2D⁺ humanos no transducidos en el modelo MM de xenoinjerto ortotópico (es decir, la contraparte *in vivo* del experimento *in vitro* que se muestra en la Figura 3E), a continuación, los solicitantes examinaron la eficacia antitumoral del control de solución salina, células T EV, células T BCMA CAR, o células T BsAb-CAR en ratones NSG con MM.1S MM mientras se co-inyectaban PBMCs agotadas en células mieloides aisladas del mismo donante. Se emprendió el agotamiento de las células mieloides mediante clasificación para evitar la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) (Figura 10A, Figura 10B). El esquema para la inyección de células MM MM.1S, linfocitos humanos normales y diversas células T transducidas se muestra en la Figura 10A, al igual que la imagenología que documenta la progresión de MM hasta el día 37. La Figura 10B y Figura 10C ilustran el porcentaje de linfocitos humanos detectados en la sangre de estos ratones. Con tiempo

adicional bajo estas condiciones, los solicitantes encontraron una diferencia dramática entre los ratones tratados con células T BCMA CAR (que no secretan BsAb; 0% de supervivencia al día 100) y ratones tratados con células T BsAb-CAR (que secretan BsAb; supervivencia del 100% el día 140; Figura 10D). Estos datos sugieren que cuantas más células inmunes NKG2D+ estén involucradas, mejor será la eficacia de las células T BsAb-CAR para la erradicación de tumores.

Equivalentes

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

La presente tecnología descrita de manera ilustrativa en la presente puede practicarse de manera adecuada en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, no descritos específicamente en la presente. Así, por ejemplo, los términos “que comprende”, “que incluye”, “que contiene”, etc. se leerán de forma amplia y sin limitación. Además, los términos y expresiones empleados en la presente se han utilizado como términos de descripción y no de limitación, y no hay intención en el uso de dichos términos y expresiones de excluir cualquier equivalente de las características mostradas y descritas o partes de las mismas, pero se reconoce que son posibles varias modificaciones dentro del alcance de la presente tecnología reivindicada.

Por lo tanto, debe entenderse que los materiales, métodos y ejemplos proporcionados en la presente son representativos de aspectos preferidos, son ejemplares y no pretenden limitar el alcance de la presente tecnología.

La presente tecnología se ha descrito en la presente de forma amplia y genérica. Cada una de las especies más limitadas y los grupos subgenéricos que entran dentro de la descripción genérica también forman parte de la tecnología actual. Esto incluye la descripción genérica de la presente tecnología con una condición o limitación negativa que elimina cualquier materia objeto del género, independientemente de si el material escindido se menciona específicamente en la presente o no.

Además, cuando las características o aspectos de la presente tecnología se describen en términos de grupos Markush, los expertos en la técnica reconocerán que la presente tecnología también se describe en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo Markush.

Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias mencionadas en la presente se incorporan expresamente en su totalidad a modo de referencia, en la misma medida que si cada una se incorporase individualmente a modo de referencia. En caso de conflictos, prevalecerá la presente especificación, incluyendo las definiciones.

Otros aspectos se exponen dentro de las siguientes reivindicaciones.

REFERENCIAS

1. Grupp, S.A., et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *The New England Journal of Medicine* 368, 1509-1518 (2013).
2. Maude, S.L., et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med* 371, 1507-1517 (2014).
3. Porter, D.L., Levine, B.L., Kalos, M., Bagg, A. & June, C.H. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *The New England Journal of Medicine* 365, 725-733 (2011).
4. Brown, C.E., et al. Regression of Glioblastoma after Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy. *N Engl J Med* 375, 2561-2569 (2016).
- 5 Velasquez, M.P., Bonifant, C.L. & Gottschalk, S. Redirecting T cells to hematological malignancies with bispecific antibodies. *Blood* 131, 30-38 (2018).
6. Maude, S. & Barrett, D.M. Current status of chimeric antigen receptor therapy for haematological malignancies. *Br J Haematol* 172, 11-22 (2016).
7. Brentjens, R.J., et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med* 5, 177ra138 (2013).
8. Porter, D.L., et al. Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. *Sci Transl Med* 7, 303ra139 (2015).
9. Oak, E. & Bartlett, N.L. Blinatumomab for the treatment of B-cell lymphoma. *Expert Opin Investig Drugs* 24, 715-724 (2015).
- 10 von Stackelberg, A., et al. Phase I/Phase II Study of Blinatumomab in Pediatric Patients With Relapsed/Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol* 34, 4381-4389 (2016).
11. Raulet, D.H. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol* 3, 781-790 (2003).
12. Groh, V., et al. Costimulation of CD8 α T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* 2, 255-260 (2001).
13. Palumbo, A. & Anderson, K. Multiple myeloma. *N Engl J Med* 364, 1046-1060 (2011).
14. Dimopoulos, M.A., et al. Daratumumab, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med* 375, 1319-1331 (2016).
15. van de Donk, N.W., Kamps, S., Mutis, T. & Lokhorst, H.M. Monoclonal antibody-based therapy as a new treatment strategy in multiple myeloma. *Leukemia* 26, 199-213 (2012).
16. Caligiuri, M.A. Human natural killer cells. *Blood* 112, 461-469 (2008).

17. Benson, D.M., et al. The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody. *Blood* 116, 2286-2294 (2010).
18. Godfrey, J. & Benson, D.M. The role of natural killer cells in immunity against multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 53, 1666-1676 (2012).
19. Szmania, S., et al. Ex vivo-expanded natural killer cells demonstrate robust proliferation in vivo in high-risk relapsed multiple myeloma patients. *J Immunother* 38, 24-36 (2015).
20. Ruggeri, L., Mancusi, A., Capanni, M., Martelli, M.F. & Velardi, A. Exploitation of alloreactive NK cells in adoptive immunotherapy of cancer. *Current Opinion in Immunology* 17, 211-217 (2005).
21. Felgar, R.E. & Hiserodt, J.C. In vivo migration and tissue localization of highly purified lymphokine-activated killer cells (A-LAK cells) in tumor-bearing rats. *Cell Immunol* 129, 288-298 (1990).
22. Brand, J.M., et al. Kinetics and organ distribution of allogeneic natural killer lymphocytes transfused into patients suffering from renal cell carcinoma. *Stem Cells Dev* 13, 307-314 (2004).
23. Champsaur, M. & Lanier, L.L. Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses. *Immunological Reviews* 235, 267-285 (2010).
24. Avery, D.T., et al. BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. *J Clin Invest* 112, 286-297 (2003).
25. Chiu, A., et al. Hodgkin lymphoma cells express TACI and BCMA receptors and generate survival and proliferation signals in response to BAFF and APRIL. *Blood* 109, 729-739 (2007).
26. Sidaway, P. Haematological cancer: Anti-BCMA CAR T cells show promise in MM. *Nat Rev Clin Oncol* 13, 530 (2016).
27. Carpenter, R.O., et al. B-cell maturation antigen is a promising target for adoptive T-cell therapy of multiple myeloma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19, 2048-2060 (2013).
28. Bellucci, R., et al. Graft-versus-tumor response in patients with multiple myeloma is associated with antibody response to BCMA, a plasma-cell membrane receptor. *Blood* 105, 3945-3950 (2005).
29. Chu, J., et al. CS1-specific chimeric antigen receptor (CAR)-engineered natural killer cells enhance in vitro and in vivo antitumor activity against human multiple myeloma. *Leukemia* 28, 917-927 (2014).

30. Chu, J., et al. Genetic modification of T cells redirected toward CS1 enhances eradication of myeloma cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 20, 3989-4000 (2014).
31. Hsi, E.D., et al. CS1, a potential new therapeutic antibody target for the treatment of multiple myeloma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14, 2775-2784 (2008).
32. Raedler, L.A. Darzalex (Daratumumab): First Anti-CD38 Monoclonal Antibody Approved for Patients with Relapsed Multiple Myeloma. *American health & drug benefits* 9, 70-73 (2016).
33. Jamieson, A.M., et al. The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity* 17, 19-29 (2002).
34. Vivier, E., Tomasello, E. & Paul, P. Lymphocyte activation via NKG2D: towards a new paradigm in immune recognition? *Current Opinion in Immunology* 14, 306-311 (2002).
35. Vallera, D.A., et al. A bispecific recombinant immunotoxin, DT2219, targeting human CD19 and CD22 receptors in a mouse xenograft model of B-cell leukemia/lymphoma. *Clin Cancer Res* 11, 3879-3888 (2005).
36. Yu, J., et al. Pro- and antiinflammatory cytokine signaling: reciprocal antagonism regulates interferon-gamma production by human natural killer cells. *Immunity* 24, 575-590 (2006).
37. Chen, L., et al. Targeting FLT3 by chimeric antigen receptor T cells for the treatment of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 31, 1830-1834 (2017).
38. Becknell, B., et al. Efficient infection of human natural killer cells with an EBV/retroviral hybrid vector. *Journal of Immunological Methods* 296, 115-123 (2005).
39. Metelitsa, L.S., Weinberg, K.I., Emanuel, P.D. & Seeger, R.C. Expression of CD1d by myelomonocytic leukemias provides a target for cytotoxic NKT cells. *Leukemia* 17, 1068-1077 (2003).
40. Hintz, M., et al. Identification of (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate as a major activator for human gammadelta T cells in *Escherichia coli*. *FEBS letters* 509, 317-322 (2001).
41. Cardone, J., et al. Complement regulator CD46 temporally regulates cytokine production by conventional and unconventional T cells. *Nature immunology* 11, 862-871 (2010).
42. D'Errico, G., Machado, H.L. & Sainz, B., Jr. A current perspective on cancer immune therapy: step-by-step approach to constructing the magic bullet. *Clin Transl Med* 6, 3 (2017).
43. Morales-Kastresana, A., Labiano, S., Quetglas, J.I. & Melero, I. Better performance of CARs deprived of the PD-1 brake. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 19, 5546-5548 (2013).

44. Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F. & Kroemer, G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nature reviews. Immunology* 8, 59-73 (2008).

LISTADO DE SECUENCIAS PARCIAL

scFv de BCMA ejemplar:

Cadena pesada de scFv de secuencia 1 anti-BCMA

ATGGGATGGAGCTCTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACC
 5 AGATTCAGCTGGTGCAGAGCGGCCCTGAGCTGAAGAAACCCGGCGAGACAGTGAAGATC
 AGCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTCCGGCACTACAGCATGAACTGGGTGAAACAGGC
 CCCTGGCAAGGGCCTGAAGTGGATGGGCCGGATCAACACCGAGAGCGGCGTGCCCATC
 TACGCCGACGACTTCAAGGGCAGATTGCGCTTCAGCGTGGAACCAGCGCCAGCACCGC
 CTACCTGGTGATCAACAACCTGAAGGACGAGGATACCGCCAGCTACTTCTGCAGCAACGA
 10 CTACCTGTACAGCCTGGACTTCTGGGGCCAGGGCACCGCCCTGACCGTGTCCAGC

Cadena ligera de scFv de secuencia 1 anti-BCMA

GACATCGTGCTGACCCAGAGCCCCCCCAGCCTGGCCATGTCTCTGGGCAAGAGA
 GCCACCATCAGCTGCCGGGCCAGCGAGAGCGTGACCATCCTGGGCAGCCACCTGATCTA
 CTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCCAGCCCCCACCCTGCTGATCCAGCTGGCTAGCAATG
 15 TGCAGACCGGCGTGCCCGCCAGATTCAGCGGCAGCGGCAGCAGAACCGACTTCACCCT
 GACCATCGACCCCGTGGAAGAGGACGACGTGGCCGTGTACTACTGCCTGCAGAGCCGG
 ACCATCCCCCGGACCTTTGGCGGAGGAACAAAGCTGGAAATCAAG

Cadena pesada de scFv de secuencia 2 anti-BCMA

ATGGGATGGAGCTCTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACC
 20 AGATTCAGCTGGTGCAGAGCGGCCCTGAGCTGAAGAAACCCGGCGAGACAGTGAAGATC
 AGCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTCAACGACTACAGCATCAACTGGGTGAAAAGAGC
 CCCTGGCAAGGGCCTGAAGTGGATGGGCTGGATCAACACCGAGACAAGAGAGCCCGCC
 TACGCCTACGACTTCCGGGGCAGATTGCGCTTCAGCCTGGAACCAGCGCCAGCACCGC
 CTACCTGCAGATCAACAACCTGAAGTACGAGGACACCGCCACCTACTTTTGCGCCCTGGA
 25 CTACAGCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCGGTGACCGTGTCCAGC

Cadena ligera de scFv de secuencia 2 anti-BCMA

GACATCGTGCTGACCCAGAGCCCCCCCAGCCTGGCCATGTCTCTGGGCAAGAGA
 GCCACCATCAGCTGCCGGGCCAGCGAGAGCGTGACCATCCTGGGCAGCCACCTGATCC
 ACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCACCCTGCTGATCCAGCTCGCCAGCAAT
 30 GTGCAGACCGGCGTGCCCGCCAGATTCAGCGGCAGCGGCAGCAGAACCGACTTCACCC
 TGACCATCGACCCCGTGGAAGAGGACGACGTGGCCGTGTACTACTGCCTGCAGAGCCGG
 ACCATCCCCCGGACCTTTGGCGGAGGCACCAAAGCTGGAAATCAAG

Secuencia de ADN de cadena pesada de scFv anti-CS-1

	AGCGTTACCG	TGAGTACAGG	CCAGGGCTGG	TATGACATGG	CACGTACAGC
35	CATCATGACC	TCGCGCGCAT	GTTACTACGT	CGCGTCAGAT	GAATCGACGC
	CTTCCTCGCT	GCAAATGTAT	GCAACCTCCA	GCAGCAAAGA	TGTTACCCTG
	ACCGCAAAGG	ACAAGTTTAA	ACAGAATTTG	CGTACGGAGA	GTGACTCCCC

GCACATCATG GGAATCTGGG AGTTGGGTCA GGGGCCTCGT CAGAAGGTAT
 GGAACATGTG GTATACAACT TTTTCGTACG GCTCAGCAAA ATGCAGCTTG
 AAAGTGTCGG CAGGTCCGCG CGTGCTGGAG GCCGGTCCGC AGCAGCTGCA
 AGTCCAGTCT

5 *Secuencia de ADN de cadena ligera de scFv anti-CS-1*

AAACTTGAGT TGAAGACCGG TGCCGGCTTC ACCTTACCGA CCAGTTATCA
 TCAACAATGC TATTACGTGG CCCTGGACGA AGCACAGGTG AATTCAATTA
 CGTTTACGTT TGATACCGGC TCTGGCAGCG GTACATTTTCG TGATCCCGTG
 GGCACCTACC GCTATTCGGC GAGTTATATC TTGCTGAAAC CTTCCCAAGG
10 TCCGAAACAG CAGTACTGGG CGGTTGGCAC CATTGTAGAC CAATCAGCCA
 AATGTACAAT CTCGGTTCGC GATGGTGTCA GTACGTCGAT GTCTAAGCAG
 TCACAGACAA TGGTTATCGA T

Secuencia de ADN de cadena pesada anti-NKG2D

CAAGTGCAGC TGGTTGAATC CGGTGGCGGT CTGGTCAAGC CGGGCGGCTC
15 TTTGCGTCTG AGCTGTGCCG CGTCGGGTTT TACCTTCAGC TCTTATGGTA
 TGCATTGGGT GCGTCAGGCG CCTGGCAAAG GTCTGGAGTG GGTTGCGTTC
 ATCCGCTACG ATGGGTCTAA CAAATATTAT GCCGACTCAG TAAAAGGACG
 CTTCACTATT AGCCGCGACA ATAGCAAAAA TACCCTGTAC CTGCAAATGA
 ATAGCCTGCG CGCCGAAGAT ACCGCCGTTT ACTATTGCGC TAAAGATCGT
20 GGCCTGGGTG ATGGTACGTA CTTGATTAC TGGGGTCAGG GCACCACCGT
 TACCGTTAGT TCA

Secuencia de ADN de cadena ligera anti-NKG2D

CAGTCAGCGC TTACGCAGCC GGCCTCGGTG TCGGGTTCCC CGGGTCAGTC
 GATCAGGATC AGCTGTAGTG GGAGCAGCTC CAACATCGGT AACAACGCAG
25 TGAAGTGGTA TCAGCAACTG CCGGGAAAAG CGCCGAAACT GCTGATTTAC
 TATGATGATT TGCTGCCAAG TGGAGTTAGT GACCGCTTTT CCGGCAGTAA
 ATCGGGTACC TCGGCTTTTC TGGCTATTTT GGGTCTCCAG AGCGAGGATG
 AAGCTGATTA TTATTGCGCC GCATGGGATG ATAGCTTAAA TGGCCCAGTT
 TTTGGCGGCG GTACTAACT GACCGTGCTG

30 *Enlazador*

GGCGGTGGCGGTTCTGGTGGCGGTGGCTCCGGCGGTGGCGGTTCT

Cadena pesada anti-NKG2D

CAAGTGCAGCTGGTTGAATCCGGTGGCGGTCTGGTCAAGCCGGGCGGCTCTTTG
 CGTCTGAGCTGTGCCGCGTCGGGTTTTACCTTCAGCTCTTATGGTATGCATTGGGTGCGT
35 CAGGCGCCTGGCAAAGGTCTGGAGTGGGTTGCGTTCATCCGCTACGATGGGTCTAACAA
 ATATTATGCCGACTCAGTAAAAGGACGCTTCACTATTAGCCGCGACAATAGCAAAAATACC
 CTGTACCTGCAAATGAATAGCCTGCGCGCCGAAGATACCGCCGTTTACTATTGCGCTAAA

GATCGTGGCCTGGGTGATGGTACGTACTTCGATTACTGGGGTCAGGGCACCACCGTTAC
CGTTAGTTCAGGTGGGGGCGGCTCT

Cadena ligera anti-NKG2D

CAGCGCTTACGCAGCCGGCGTCGGTGTCGGGTTCGCCGGGTCAGTCGATCACGA
5 TCAGCTGTAGTGGGAGCAGCTCCAACATCGGTAACAACGCAGTGAAGTGGTATCAGCAAC
TGCCGGGAAAAGCGCCGAAACTGCTGATTTACTATGATGATTTGCTGCCAAGTGGAGTTA
GTGACCGCTTTTCCGGCAGTAAATCGGGTACCTCGGCTTTTCTGGCTATTTCCGGGTCTCC
AGAGCGAGGATGAAGCTGATTATTATTGCGCCGCATGGGATGATAGCTTAAATGGCCCAG
TTTTTGGCGGCGGTACTAAACTGACCGTGCTG

10 *Secuencias de HMA*

CCGAGCGGCCAGGCGGGCGCGGCGGCATCGGAGTCCCTGTTTGTGTCAAATCAC
GCCTAC

Cadena pesada anti-CS1

CTCCGTGACGGTGTCGACGGGCCAAGGATGGTACGATATGGCACGGACCGCGAT
15 TATGACATCGCGGGCGTGCTATTACGTGGCCAGCGATGAGTCGACCCCTTCCTCTCTGCA
AATGTATGCCACCTCCTCTTCAAAGACGTGACTCTGACTGCGAAAGACAAATTTAAACAG
AATCTGCGCACCGAAAGCGATAGCCACATATCATGGGCATCTGGGAAGTGGGCCAGGG
CCCCCGCCAGAAAGTGTGGAACATGTGGTACACCACCTTCAGCTATGGTTCGGCCAAATG
TTCCCTGAAGGTATCAGCCGGCCCGCGCGTTCTTGAGGCGGGTCCGCAGCAGCTGCAG
20 GTACAGAGC

Cadena ligera anti-CS1

AAACTGGAAGTCAAGACGGGTGCGGGATTTACCCTCCCTACGAGCTATCACCAGC
AGTGCTATTACGTGGCGCTTGACGAAGCGCAGGTGAAGTCTATTACCTTTACCTTTGATAC
AGGATCAGGCAGCGGTACGTTCCGTGATCCGGTAGGTACGTACCGGTATAGTGCAAGCT
25 ATATCCTTCTGAAACCTTCTCAGGGTCCGAAACAGCAGTACTGGGCGGTGGGAACGATCG
TGGACCAGTCTGCCAAATGTACAATTTAGTTTCGCGACGGAGTTAGCACCTCCATGAGCA
AGCAGTCCCAAACCATGGTGATTGACTCT

Secuencia 2 de cadena pesada anti-BCMA

CAGATTACAGCTGGTGACAGAGCGGCCCTGAGCTGAAGAAACCCGGCGAGACAGTG
30 AAGATCAGCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACCGACTACAGCATCAACTGGGTGAAA
AGAGCCCCTGGCAAGGGCCTGAAGTGGATGGGCTGGATCAACACCGAGACAAGAGAGC
CCGCCTACGCCTACGACTTCCGGGGCAGATTGCGCTTCAGCCTGGAAACCAGCGCCAGC
ACCGCCTACCTGCAGATCAACAACCTGAAGTACGAGGACACCGCCACCTACTTTTGCGCC
CTGGACTACAGCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACCGTGTCAG
35 C

Secuencia 2 de cadena ligera anti-BCMA

GACATCGTGCTGACCCAGAGCCCCCCCAGCCTGGCCATGTCTCTGGGCAAGAGA
GCCACCATCAGCTGCCGGGCCAGCGAGAGCGTGACCATCCTGGGCAGCCACCTGATCC
ACTGGTATCAGCAGAAGCCCCGGCCAGCCCCCCCACCCTGCTGATCCAGCTCGCCAGCAAT
GTGCAGACCGGCGTGCCCGCCAGATTCAGCGGCAGCGGCAGCAGAACCGACTTCACCC
5 TGACCATCGACCCCGTGGAAGAGGACGACGTGGCCGTGTACTACTGCCTGCAGAGCCGG
ACCATCCCCCGGACCTTTGGCGGAGGCACCAAACCTGGAAATCAAG