

DESCRIPCIÓN

CÉLULAS ASESINAS NATURALES DISEÑADAS PARA EXPRESAR RECEPTORES DE ANTÍGENO QUIMÉRICO CON BLOQUEO DE PUNTOS DE CONTROL INMUNITARIO

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de las Solicitudes de Patente Provisional de los Estados Unidos Nos. 62/666,665, presentada el 3 de mayo de 2018, y 62/666,965, presentada el 4 de mayo de 2018, que se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

INCORPORACIÓN DE LISTADO DE SECUENCIAS

[0002] La lista de secuencias que está contenida en el archivo llamado "UTFC1366WO.txt", que es de 2 KB (medido en Microsoft Windows) y fue creado el 3 de mayo de 2019, se presenta junto con el envío electrónico y se incorpora como referencia Aquí.

ANTECEDENTES

1. Campo

[0003] La presente invención se refiere en general a los campos de la inmunología y la medicina. Más particularmente, se trata de células asesinas naturales (NK) diseñadas para expresar un receptor de antígeno quimérico con expresión alterada de un gen de punto de control inmunológico.

2. Descripción del arte relacionado

[0004] En los últimos años, la terapia celular adoptiva que utiliza células T autólogas transducidas con receptor de antígeno quimérico (CAR) ha demostrado ser un enfoque muy poderoso para el tratamiento del cáncer, lo que

ha llevado a la aprobación de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para la leucemia de células B y linfoma. Sin embargo, persisten desafíos, que incluye el desacoplamiento de la citotoxicidad contra las células tumorales de la toxicidad sistémica, la búsqueda de soluciones para las recaídas negativas del antígeno objetivo y desarrollar productos universales de terapia celular listos para usar para evitar los obstáculos logísticos de la generación de productos autólogos, a la vez que se manejan los desafíos de los Productos de células T alogénicas, tales como la enfermedad de injerto contra hospedera (GVHD) (Hartmann *et al.*, 2017).

10

[0005] Las células asesinas naturales (NK) son contendientes atractivos ya que median la citotoxicidad eficaz contra las células tumorales y, a diferencia de las células T, carecen del potencial de causar GVHD en el entorno alogénico. Por lo tanto, las células NK podrían estar disponibles como un producto de terapia celular listo para usar para uso clínico inmediato (Daher *et al.*, 2018). La sangre del cordón umbilical (CB) es una fuente fácilmente disponible de células NK alogénicas con el potencial de una escalabilidad clínica generalizada. La potente actividad de las células NK transducidas con CAR se ha demostrado en el entorno preclínico en diferentes modelos de tumores, y actualmente se están llevando a cabo ensayos clínicos de células NK transducidas con CAR alogénicas (Mehta *et al.*, 2018). Si bien las moléculas de punto de control inmunológico, como PD-1, están siendo dirigidas a mejorar la función de las células CAR-T, hasta la fecha no se ha dirigido ninguna molécula de punto de control inmunológico en las células CAR-NK (Gay *et al.*, 2017).

25

[0006] Las células NK funcionales pueden derivarse de varias fuentes. Las células NK autólogas se pueden generar de forma reproducible *in vitro*, pero tienen una actividad limitada contra los tumores autólogos, que pueden

no superarse mediante ingeniería CAR. La sangre del cordón umbilical (CB) es una fuente fácilmente disponible de células NK alogénicas con claras ventajas. La CB está disponible como un producto congelado listo para usar, una ventaja que se ha visto reforzada por métodos para generar un gran número de células NK altamente funcionales a partir de unidades CB congeladas *ex vivo*. La generación de células NK transducidas con CAR a partir de unidades de CB congeladas almacenadas en grandes inventarios de bancos de CB globales es prometedora para una escalabilidad generalizada que no se puede replicar con donantes adultos individuales que requieren detección y leucocitaféresis. Sin embargo, una de las principales desventajas de las células NK es su falta de persistencia después de la transferencia adoptiva en ausencia de soporte de citoquinas. Por lo tanto, la ingeniería de células CAR-NK para expresar citoquinas para mejorar su persistencia es importante para su actividad clínica. Al hacerlo, las células CAR-NK pueden regular al alza las moléculas de los puntos de control que podrían limitar su funcionalidad. Por lo tanto, existe la necesidad de eliminar las moléculas de punto de control en las células NK diseñadas con CAR para mejorar su potencia y actividad clínica.

RESUMEN

20

[0007] En una primera implementación, la presente divulgación proporciona células asesinas naturales (NK) aisladas diseñadas para expresar (1) un receptor de antígeno quimérico (CAR) y/o un receptor de células T (TCR) y (2) IL-15 humana (hIL-15) y esencialmente no tener expresión de CISH. En algunos aspectos, la célula NK está diseñada para expresar un CAR. En ciertos aspectos, la célula NK está diseñada para expresar un TCR. En aspectos particulares, la célula NK está diseñada para expresar un CAR y TCR o 3 o 4 receptores de

antígenos. En algunos aspectos, las células NK son GMP cuidadoras. En ciertos aspectos, las células NK son alogénicas o autólogas.

[0008] En algunos aspectos, la célula NK se deriva de sangre de
5 cordón, sangre periférica, médula ósea, células CD34⁺ o iPSCs. En ciertos aspectos, la célula NK se deriva de la sangre del cordón. En aspectos particulares, la sangre del cordón umbilical se ha congelado previamente.

[0009] En ciertos aspectos, el CAR y/o TCR tiene especificidad
10 antigénica para ligandos CD19, CD319/CS1, ROR1, CD20, CD5, CD7, CD22, CD70, CD30, BCMA, CD25, NKG2D, MICA/MICB, antígeno carcinoembrionario, alfafetoproteína, CA-125, MUC-1, antígeno tumoral epitelial, antígeno asociado a melanoma, p53 mutado, ras mutado, HER2/Neu, ERBB2, proteína de unión a folato, glicoproteína gp120 de la envoltura del HIV-1, glicoproteína gp41 de la
15 envoltura del HIV-1, GD2, CD123, CD33, CD30, CD56, c-Met, mesotelina, GD3, HERV-K, IL-11Ralfa, cadena kappa, cadena lambda, CSPG4, ERBB2, WT-1, EGFRvIII, TRAIL/DR4 y/o VEGFR2.

[00010] En aspectos adicionales, la célula NK expresa además una
20 segunda o tercera citoquina. En aspectos particulares, la citoquina es IL-15, IL-21 o IL-12.

[00011] En otra implementación, se proporciona un método para
producir células NK de las implementaciones que comprende obtener una
25 población inicial de células NK; cultivar la población inicial de células NK en presencia de células presentadoras artificiales (APC); introducir un vector de expresión CAR y/o TCR en las células NK; expandir las células NK en presencia

de APC, con lo que se obtienen células NK expandidas; e interrumpir la expresión de CISH en las células NK expandidas.

[00012] En algunos aspectos, interrumpir la expresión comprende el uso de silenciamiento génico mediado por CRISPR. En ciertos aspectos, el silenciamiento génico mediado por CRISPR comprende poner en contacto las células NK CAR con sgRNA y Cas9. En aspectos particulares, el sgRNA se dirige al exón 4 de CISH. En aspectos específicos, el sgRNA comprende crRNA1 que tiene la secuencia AGGCCACATAGTGCTGCACA (SEQ ID NO: 1) y crRNA2 que tiene la secuencia TGTACAGCAGTGGCTGGTGG (SEQ ID NO: 2).

[00013] En algunos aspectos, la población de partida de células NK se obtiene aislando células mononucleares usando un gradiente de densidad ficoll-paque. En aspectos particulares, las APC son APC irradiadas con rayos gamma. En algunos aspectos, las APC son APC universales (uAPC). En aspectos específicos, las APC están diseñadas para expresar 41BB e IL-21. En algunos aspectos, las uAPC están diseñadas para expresar (1) CD48 y/o CS1 (CD319), (2) interleuquina-21 unida a membrana (mbIL-21) y (3) ligando 41BB (41BBL). En aspectos particulares, las células NK y las APC están presentes en una proporción de 1:1 a 1:10, tal como una relación 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 o 1:10. En ciertos aspectos, las células NK y las APC están presentes en una proporción de 1:2.

[00014] En ciertos aspectos, las células NK en cultivo con APC se expanden más en presencia de IL-2. En ciertos aspectos, la IL-2 está presente en una concentración de 100-300 U/mL, como 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275 o 300 U/mL. En algunos aspectos, la IL-2 está presente en una concentración de 200 U/mL.

[00015] En algunos aspectos, la introducción comprende la transducción. En ciertos aspectos, el constructo de expresión de CAR y/o TCR es un vector lentivíral o retroviral.

5

[00016] En aspectos particulares, el CAR y/o TCR tiene especificidad antigénica para ligandos CD19, CD319/CS1, ROR1, CD20, CD5, CD7, CD22, CD70, CD30, BCMA, CD25, NKG2D, MICA/MICB, antígeno carcinoembrionario, alfafetoproteína, CA-125, MUC-1, antígeno tumoral epitelial, antígeno asociado a melanoma, p53 mutado, ras mutado, HER2/Neu, ERBB2, proteína de unión a folato, glicoproteína gp120 de la envoltura del HIV-1, glicoproteína gp41 de la envoltura del HIV-1, GD2, CD123, CD23, CD30, CD56, c-Met, mesotelina, GD3, HERV-K, IL-11Ralfa, cadena kappa, cadena lambda, CSPG4, ERBB2, WT-1, EGFRvIII, TRAIL/DR4 y/o VEGFR2 .

15

[00017] En algunos aspectos, el constructo de expresión de CAR y/o TCR expresa además una citoquina, tal como 2 o 3 citoquinas. En algunos aspectos, la citoquina es IL-15, IL-21 o IL-12.

20

[00018] En algunos aspectos, la célula NK ha activado la señalización del objetivo de rapamicina (mTOR) en mamíferos en comparación con las células NK con expresión de CISH. En ciertos aspectos, la célula NK ha aumentado la señalización de JAK/STAT en comparación con una célula NK con expresión de CISH.

25

[00019] En aspectos adicionales, el método comprende además criopreservar la población de células NK expandidas.

[00020] También se proporciona en el presente documento una composición farmacéutica que comprende una población de células NK de las implementaciones o células NK producidas mediante el método de las implementaciones y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra
5 implementación, se proporciona una composición que comprende una cantidad eficaz de células NK de las implementaciones o células NK producidas mediante el método de las implementaciones para uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno en un sujeto.

10 **[00021]** En otra implementación, se proporciona el uso de una composición que comprende una cantidad eficaz de células NK de las implementaciones o células NK producidas mediante el método de las implementaciones para el tratamiento de un trastorno relacionado con la inmunidad en un sujeto.

15 **[00022]** Una implementación adicional proporciona un método para tratar un trastorno relacionado con la inmunidad en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de células NK de las implementaciones o células NK producidas mediante el método de las implementaciones.

20 **[00023]** En algunos aspectos de las implementaciones anteriores, el trastorno relacionado con el sistema inmunitario es un cáncer, un trastorno autoinmunitario, una enfermedad de injerto contra hospedera, rechazo de aloinjerto o enfermedad inflamatoria. En ciertos aspectos, el trastorno relacionado
25 con el sistema inmunitario es una afección inflamatoria y las células inmunitarias no tienen esencialmente expresión del receptor de glucocorticoides. En ciertos aspectos, al sujeto se le ha administrado o se le está administrando una terapia con esteroides. En algunos aspectos, las células NK son autólogas o alogénicas.

En ciertos aspectos, el trastorno inmunológico es un cáncer. En algunos aspectos, el cáncer es un cáncer sólido o una malignidad hematológica.

[00024] En aspectos adicionales de las implementaciones anteriores, el método comprende además administrar al menos un segundo agente terapéutico. En algunos aspectos, el al menos un segundo agente terapéutico comprende quimioterapia, inmunoterapia, cirugía, radioterapia o bioterapia. En algunos aspectos, las células NK y/o el al menos un segundo agente terapéutico se administran por vía intravenosa, intraperitoneal, intratraqueal, intratumoral, intramuscular, endoscópica, intralesional, percutánea, subcutánea, regional o mediante inyección directa o perfusión.

[00025] En algunos aspectos, las células NK sin esencialmente expresión de CISH tienen una función mejorada en comparación con las células NK con expresión de CISH. En ciertos aspectos, la función mejorada se mide mediante tinción intracelular para IFN- γ y TNF- α , desgranulación de CD107a y destrucción de tumores mediante ensayo de liberación de ^{51}Cr . En algunos aspectos, la función mejorada se mide mediante el aumento de la expresión de granzima-b, perforina, TRAIL, CD3z, Eomes, T-bet, DAP12, DNAM, CD25 y/o Ki67.

[00026] Otros objetos, características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Se debe entender, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican las implementaciones preferidas de la invención, se dan a modo de ilustración únicamente, ya que varios cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la invención resultarán evidentes para aquellos versados en el arte a partir de esta descripción detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[00027] Los siguientes dibujos forman parte de la presente especificación y se incluyen para demostrar más ciertos aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor con referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de implementaciones específicas presentadas en este documento.

[00028] Las FIGS. 1A-1B: CIS se regula al alza en NK CAR19/IL-15 y se correlaciona con una función disminuida de una manera dependiente del tiempo. (FIG. 1A) La qPCR para el mRNA de CISH se realizó el día 0 (células NK basales en reposo) y el día 7 y el día 14 después de la transducción con CAR. Se utilizó como gen de mantenimiento el 18S. El mRNA de CISH se regula al alza de una manera dependiente del tiempo después de la expansión de NK CAR19/IL-15. **(FIG. 1B)** Se realizó un ensayo de liberación de cromo para evaluar la citotoxicidad o NK CAR19/IL-15 el día 7 y el día 14 después de la transducción de CAR. Los resultados muestran una citotoxicidad disminuida con el tiempo que se correlaciona con la regulación al alza de CISH.

[00029] Las FIGS. 2A-2C: CISH KO eficiente usando CRISPR-Cas para apuntar al exón 4. Se utilizó CISH CRISPR-Cas9 para apuntar al exón 4 de CISH usando 2 gRNA el día 14 después de la expansión de NK. La eficacia de desactivación se evaluó mediante **(FIG. 2A)** PCR para el gen CISH el día 3 después de KO, **(FIG. 2B)** Western blot para la proteína CIS el día 7 **(FIG. 2C)** por citometría de flujo el día 7.

[00030] Las FIGS. 3A-3D: la transducción de CISH KO y CAR19/IL-15 mejoran la función y la citotoxicidad de forma sinérgica. El día 14 después de la transducción de CAR (FIGS. 3A, B) se realizaron estudios funcionales que mostraban una mayor producción de citoquinas y desgranulación en CISH KO NT y CISH KO CAR19/IL-15 en comparación con las contrapartes WT. (FIGS. 3C, D), Ensayo de liberación de cromo que muestra una citotoxicidad mejorada en los grupos CISH KO.

[00031] Las FIGS. 4A-4D: CISH KO en células NT NK y NKCAR19/IL-15 mejora la formación de sinapsis inmunológica con células de linfoma Raji. El día 14 después de la transducción de CAR, se realizó microscopía confocal para comparar la formación de sinapsis inmune contra células Raji de CISH KO NT y CAR19/IL-15 frente a controles cas9. (FIG. 4A) La acumulación de F-actina y CAR en la sinapsis aumenta. (FIG. 4B) Se acorta la distancia MTOC a la sinapsis. (FIG. 4C), La colocalización de CAR con F-actina aumenta en la tendencia de la sinapsis inmune. (FIG. 4D) para aumentar la colocalización de CD19, F-actina y CAR en la sinapsis inmune.

[00032] Las FIGS. 5A-5B: Las células NK CISH KO CAR19/IL-15 mejoran el control del tumor y la supervivencia en un modelo de ratón con linfoma Raji. El día 0, los ratones se inyectaron con células Raji (20K/ratón) solas en el grupo 1 o en combinación con las diferentes preparaciones de NKCAR19/IL-15 (10^7 células/ratón WT, control Cas9 o CISH KO). (FIG. 5A) BLI mostró un mejor control del tumor en el grupo que recibió las células CISH KO. (FIG. 5B) Curva de supervivencia que muestra una mayor supervivencia en el grupo que recibió las células CISH KO.

[00033] La FIG. 6: En el momento del sacrificio, se realizó un análisis de citometría de flujo en sangre procesada, bazo, hígado, BM para evaluar la presencia de Raji y NK CAR. En el ratón que recibió células CISH KO CAR19/IL-15, no hubo evidencia de linfoma Raji y se detectó una población clara de células NK que expresaban CAR en PB y órganos.

[00034] Las FIGS. 7A-7E: CISH KO eficiente usando CRISPR-Cas9 para apuntar al exón 4 de CISH (FIG. 7A) Resultados de RTqPCR que muestran un aumento dependiente del tiempo en la transcripción de CISH en los días 14 y 21 en células NT y NK transducidas con iC9/CAR19/IL-15. (FIG. 7B) representación esquemática de CISH KO mediada por CRISPR usando dos RNA guía diferentes (gRNA) (SEQ ID NO: 1-2) dirigidos al exón 4. (FIG. 7C) Resultados de PCR realizados 2 días después de la electroporación de RNP, muestran la eficiencia CISH KO con > 90% indel. (FIG. 7D) Western Blot realizada 7 días después de la electroporación de RNP que muestra el porcentaje de pérdida de proteína, se utilizó β -actina como gen de referencia. (FIG. 7E) Resultados de secuenciación Sanger que muestran múltiples picos en las muestras de NT CISH KO y CAR CISH KO en comparación con sus respectivos controles simulados cas9, que corresponden a eventos de NHEJ mediados por CRISPR. Las flechas indican la posición del par de bases donde comienza la edición de genes.

[00035] Las FIGS. 8A-8F: CISH KO mejora la función y la citotoxicidad en células NT y NK transducidas con iC9/CAR19/IL-15. Estudios funcionales que comparan la actividad de diferentes condiciones de células NK (NT, NT CISH KO, iC9/CAR19/IL-15, iC9/CAR19/IL-15 CISH KO) contra el linfoma Raji. (FIG. 8A) Gráficos FACS representativos de la expresión IFN γ , TNF α y CD107a. (FIG. 8B) Gráficos de barras del porcentaje de expresión de IFN γ , TNF α y CD107a en células NK, las flechas representan SD (n = 6). (FIG. 8C) Ensayo de

liberación de cromo a diferentes proporciones E: T (5:1, 2:1, 1:1, 0,5:1) (n = 3). **(FIG. 8D)** microscopía confocal que muestra la formación de sinapsis inmunes entre las células NK y las células del linfoma Raji (n = 3). **(FIG. 8E)** gráfico de MTOC a la distancia de sinapsis. **(FIG. 8F)** Incluye experimento que muestra el porcentaje de muerte del linfoma Raji durante 12 horas a diferentes raciones E: T 1:1, 1:2 y 1:4, comparando iC9/CAR19/IL-15 vs iC9/CAR19/IL-15 CISH KO.

[00036] Las FIGS. 9A-9H: Fenotipo y firma molecular de células CISH KO iC9/CAR19/IL-15 NK. **(FIG. 9A)** Mapa de calor comparativo de los datos de citometría de masas que muestran la mediana de la expresión del marcador en CISH KO iC9/CAR19/IL-15 en comparación con el control Cas9 iC9/CAR19/IL-15 (n = 2) que deja ver muestras de una expresión más baja o más alta en CISH KO. **(FIG. 9B)** Gráficos de Visne representativos de marcadores seleccionados que muestran una expresión aumentada en CISH KO iC9/CAR19/IL-15 (CTRL) en comparación con el control Cas9 iC9/CAR19/IL-15. Inserto tsne-1 vs tsne2. **(FIG. 9C)** mapa de calor que muestra genes expresados diferencialmente en células NK iC9/CAR19/IL15 CTRL frente a CISH KO (n = 2). **(FIG. 9D)** Gráficos de análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes que muestran el enriquecimiento en la señalización de TNF α mediante la respuesta de NF κ B e IFN γ en células NK CISH KO iC9/CAR19/IL15 en comparación con células NK iC9/CAR19/IL15 de control Cas9. **(FIG. 9E)** Gráfico de Volcano que muestra algunos de los genes que están regulados positivos en las células NK iC9/CAR19/IL15 CISH KO en comparación con las células NK iC9/CAR19/IL-15 de control Cas9 (n = 2). **(FIG. 9F)** Gráficos de análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes que muestran enriquecimiento en la señalización de IL-2/STAT5, señalización de STAT3/IL-6 y la respuesta inflamatoria en células NK CISH KO iC9/CAR19/IL15 en comparación con células NK iC9/CAR19/IL15 de control Cas9. **(FIG. 9G)** Histogramas representativos que muestran una regulación positiva mejorada de p-STAT5, p-STAT3 y p-PLC γ 1 en

células NK CISH KO iC9/CAR19/IL15 en comparación con células NK iC9/CAR19/IL15 de control Cas9 después de cocultivo con células de linfoma Raji durante 30 min. **(FIG. 9H)** gráficos de barras que muestran el MFI de p-STAT5, p-STAT3 y p-PLCg1 en el control Cas9 frente a las células NK CISH KO
5 iC9/CAR19/IL15.

[00037] Las FIGS. 10A-10L: CISH KO reprograma el metabolismo de las células NK iC9/CAR19/IL-15. **(FIG. 10A)** Análisis de GSEA que muestra el enriquecimiento en conjuntos de genes de MTORC1, glucólisis e hipoxia. **(FIG.**
10 **10B)** Mapa de calor que muestra la expresión diferencial de genes asociados con las diferentes rutas metabólicas enriquecidas. **(FIG. 10C)** Análisis de red que muestra genes regulados positivos (círculos) asociados con rutas metabólicas enriquecidas (nodos): señalización de IL-2/STAT5 (marrón), mTORC1, glucólisis e hipoxia, se muestran los bordes entre la ruta y genes específicos. **(FIG. 10D)**
15 Diagrama esquemático que representa la hipótesis de cómo la delección de CIS modula la ruta metabólica de iC9/CAR19/IL-15 mediante la regulación positiva de MTORC1, HIF-1a y la glucólisis. La CISH KO modula la aptitud metabólica de las células NK en respuesta a las células tumorales Raji. **(FIGS. 10E-10F)** Ensayo de caballito de mar que muestra los resultados de ECAR para NT, NTKO, CAR, CARKO después de cocultivo con Raji durante 2 horas. **(FIG. 10G)** Resultados de la prueba colorimétrica de glucosa realizada en el sobrenadante recogido de los pozos donde se cocultivaron diferentes condiciones de células NK con Raji durante 4 horas. **(FIG. 10H)** Vía de glucólisis generada mediante IPA que muestra la regulación positiva de las enzimas de glucólisis representadas por los nodos coloreados en rojo. **(FIG. 10I)** Intensidad fluorescente media (MFI) de fosfo-S6 en CAR y CAR CISH KO. **(FIG. 10J)** ensayo de caballito de mar que muestra resultados de OCR para NT, NTKO, CAR, CARKO. **(FIGS. 10K-10L)** Resultados de microscopía confocal evaluando lisosomas, mitocondrias y núcleo y
25

comparando estadísticamente sus números y volúmenes entre NTcas9 y NTKO, CAR cas9 y CAR KO.

[00038] Las FIGS. 11A-11I: Las células NK iC9/CAR19/IL-15 de CISH KO mejoran el control del tumor y la supervivencia en un modelo de ratón con linfoma Raji incluso a dosis de infusión bajas. (FIG. 11A) Diagrama esquemático que representa la línea de tiempo de los experimentos *in vivo*. (FIG. 11B) Resultados de imágenes bioluminiscentes (BLI) y (FIG. 11C) curvas de supervivencia que comparan los grupos de ratones que recibieron Raji solo (n = 5) vs Raji + NT (n = 5) vs Raji + NT cas9 CTRL (n = 5) frente a Raji + NT CISH KO (n = 5). (FIG. 11D) Porcentaje de células NK de las células CD45 + presentes en la sangre periférica de ratones que comparan los controles Cas9 de células NK iC9/CAR19/IL-15 frente a CISH KO en días diferentes. (FIG. 11E) Resultados de imagen BLI (FIG. 11F) radiancia promedio (FIG. 11G) curvas de supervivencia y (FIG. 11H) curvas de peso corporal que comparan los siguientes grupos de ratones Raji solo (n = 5) vs Raji + iC9/CAR19/IL-15 3x10⁶ control cas9 (n = 5) vs iC9/CAR19/IL-15 3x10⁶ CISH KO (n = 5) vs iC9/CAR19/IL-15 10x10⁶ control cas9 (n = 5) vs iC9/CAR19/IL-15 10x10⁶ CISH KO (n = 3). h, imágenes de patología representativas del hígado (paneles de la izquierda) y la médula ósea (paneles de la derecha) que muestran tinción de H&E en los paneles superiores y tinción inmunohistoquímica de CD20 en los paneles inferiores comparando Raji solo frente a CAR19/IL-15 CTRL (10x10⁶) frente a CAR19/IL-15 Grupos CISH KO (10x10⁶). (FIG. 11I) gráficos de los pesos corporales de los ratones a lo largo del tiempo entre los diferentes grupos.

25

[00039] Las FIGS. 12A-12D: Identificación de sitios fuera del objetivo de Cas9 mediante GUIDE-Seq y cuantificación de sitios de escisión potenciales fuera del objetivo de Cas9 mediante la tecnología rhAmpSeq™.

(FIG. 12A) Secuencias de sitios fuera del objetivo identificados por GUIDE-Seq para dos guías que se dirigen al locus CISH. La secuencia de la guía se enumera en la parte superior con los sitios fuera de destino que se muestran a continuación. El sitio de destino se identifica con un cuadrado negro. Las discrepancias con la guía se muestran y resaltan con inserciones en gris. El número de lecturas de secuenciación de GUIDE-Seq se muestra a la derecha de cada sitio. Se entregó 10 μ M de Alt-R crRNA XT complejoado con Alt-R tracrRNA en células HEK293 que expresan constitutivamente la nucleasa Cas9 por nucleofección. (FIG. 12B) Los gráficos circulares indican el porcentaje fraccionario del total de recuentos de lectura específicos únicos de CRISPR-Cas9 que están dentro y fuera del objetivo. La edición total en los sitios dentro y fuera del objetivo identificados por GUIDE-Seq se midió utilizando rhAmpSeq, un enfoque de enriquecimiento dirigido multiplexado para NGS. Para cada una de las dos guías de orientación de CISH, se diseñaron amplicones alrededor de cada sitio de escisión de Cas9 con lecturas > 1% de las lecturas de GUIDE-Seq en el objetivo. Los complejos de RNP formados con WT Cas9 o Alt-R HiFi Cas9 se administraron mediante electroporación en células NK expandidas. (FIG. 12C) Formación de INDEL en cada loci objetivo para la guía CISH 1 (panel 1, 11-plex) y la guía CISH 2 (panel 2, 70-plex) cuando se administró un único complejo RNP. (FIG. 12D) Formación de INDEL en cada loci objetivo cuando se coadministraron la guía CISH 1 y la guía CISH 2. El locus en el objetivo se indica con un asterisco.

[00040] Las FIGS. 13A-13C: la transducción iC9/CAR19/IL-15 y la eficiencia CISH KO son estables en el tiempo. (FIG. 13A) Análisis de citometría de flujo de CD56 en células transducidas y de control. (FIG. 13B) Viabilidad celular de células transducidas. (FIG. 13C) Western blots de varios días durante las transducciones.

[00041] Las FIGS. 14A-14D: Fenotipo y firma molecular de las células CISH KO NT NK. **(FIGS. 14A-14B)** Mapa de calor de la firma genética. **(FIGS. 14C-14D)** Análisis de células CISH KO NT NK.

5 **[00042] La FIG. 15:** La dosis única de CAR19/IL-15 prolonga la supervivencia en un modelo de ratón con linfoma Raji, pero no conduce a la curación.

[00043] Las FIGS. 16A-16C: Las células CISH KO iC9/CAR19/IL-15
10 NK aún se pueden eliminar usando dimerizador. **(FIGS. 16A-16B)** Análisis de citometría de flujo de células CISH KO NT NK. **(FIG. 16C)** Porcentaje de células CAR + NK en sangre, hígado, bazo o médula ósea.

[00044] La FIG. 17: No hay evidencia de linfoma Raji en ratones que
15 recibieron altas dosis de células NK CISH KO iC9/CAR19/IL-15.

DESCRIPCIÓN DE LAS IMPLEMENTACIONES ILUSTRATIVAS

[00045] La familia de proteínas supresoras de la señalización de
20 citoquinas (SOCS) juega un papel importante en la biología de las células NK al atenuar la señalización de las citoquinas, la actividad funcional y la inmunidad de las células NK al cáncer. Uno de sus miembros, la proteína que contiene SH2 inducible por citoquinas (CIS), codificada por el gen CISH, se ha identificado como una importante molécula de control intracelular en las células NK y es inducida por
25 citoquinas, incluida la IL-15. Por lo tanto, los inventores buscaron determinar si las células NK modificadas genéticamente están sujetas a los mismos circuitos contrarreguladores que regulan fisiológicamente dimerizador la señalización de citoquinas de manera negativa en células NK no modificadas, mediante la

evaluación de la expresión de CIS y las consecuencias de la delección de CISH en células CB-NK transducidas CAR19/IL-15.

5 **[00046]** Los presentes estudios demostraron un enfoque novedoso para combinar la ingeniería CAR con la eliminación de CISH (KO) que da como resultado un control de tumores superior en comparación con cualquier enfoque solo. CISH KO mejoró la actividad de las células CB-NK transducidas con iC9/CAR19/IL-15 al aumentar la señalización JAK/STAT. Además, se demostró que dirigirse a CISH modula el metabolismo de las células CAR-NK y mejora su "aptitud" activando la vía de señalización del objetivo de rapamicina en mamíferos (mTOR) e induciendo un cambio glucolítico en su metabolismo. Esta es la primera demostración que la edición de genes de una molécula de punto de control inmunológico mejora la actividad y la aptitud de las células CAR.NK al modular su vía metabólica.

15

[00047] Específicamente, los presentes estudios mostraron que CISH se induce en células CB-NK transducidas con CAR19/IL-15 después de 7 días de expansión, según lo determinado por mRNA qPCR (**FIG. 1**). Para examinar las consecuencias funcionales de la delección de CISH en células NK transducidas con CAR.19/IL-15, se desarrolló un protocolo para la edición de genes mediada por ribonucleoproteína Cas9 combinada (Cas9 RNP) para silenciar la transducción retroviral y CISH con el constructo iC9/CAR.CD19/ IL-15. Siete días después de la transducción de células CB-NK con el constructo iC9/CAR.19/IL-15, las células NK transducidas se nucleofectaron con Cas9 solo (control Cas9) o Cas9 precargado con crRNA sintetizado químicamente: dúplex de tracrRNA dirigido al exón CISH 4. A continuación, las células se cultivaron con el clon 9.mbIL21 e IL-2 (100 UI/ml) durante 7 días adicionales para potenciar la expansión. La eficiencia de edición de genes se cuantificó mediante PCR (día 2) y la reducción en los niveles de

25

expresión de proteínas se determinó mediante citometría de flujo (día 7) en células CAR-NK. La desactivación de CISH dio como resultado una función significativamente mejorada de las células CB-NK transducidas con iC9/CAR19/IL-15 contra las células tumorales Raji, especialmente en proporciones efector: objetivo más bajas, según lo evaluado por tinción intracelular para IFN- γ y TNF- α , desgranulación de CD107a y destrucción de tumores mediante ensayo de liberación de ^{51}Cr . Dados los prometedores datos *in vitro*, las células CAR-NK derivadas de CB manipuladas se probaron *in vivo* en un modelo murino de linfoma Raji en ratón. Los ratones fueron tratados con una sola inyección de 3 millones o 10 millones de células NK y se demostró que CISH KO en CB-NK transducido con iC9/CAR19/IL-15 mejoró su persistencia *in vivo* y mejoró la supervivencia de los ratones en ambos niveles de dosis, pero se observó una supervivencia a largo plazo más impresionante con el nivel de dosis de 10 millones.

[00048] En consecuencia, en determinadas implementaciones, la presente divulgación proporciona métodos para producir células NK mediante ingeniería genética para expresar un CAR, como por transducción retroviral, y alterando la expresión de CISH, como mediante el uso de eliminación de CISH mediada por CRISPR-Cas9. El constructo CAR puede expresar una citoquina, como IL-15.

[00049] Las células NK proporcionadas en el presente documento pueden usarse para mejorar las terapias celulares CAR adoptivas mejorando la potencia, permitiendo así una infusión de un número menor de células CAR NK a pacientes con toxicidad disminuida. Por tanto, implementaciones adicionales proporcionan métodos para administrar terapia celular adoptiva con células CAR NK para tratar pacientes con cáncer con una neoplasia maligna hematológica,

cánceres sólidos, enfermedades infecciosas o enfermedades inmunes que incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de injerto contra hospedera.

I. Definiciones

5

[00050] Como se usa en este documento, "esencialmente libre", en términos de un componente especificado, se usa en este documento para significar que ninguno de los componentes especificados se ha formulado a propósito en una composición y/o está presente solo como un contaminante o en 10 cantidades traza. La cantidad total del componente especificado resultante de cualquier contaminación no intencionada de una composición es por lo tanto muy por debajo del 0,05%, preferiblemente por debajo del 0,01%. Lo más preferido es una composición en la que no se pueda detectar ninguna cantidad del componente especificado con métodos analíticos estándar.

15

[00051] Como se usa en la presente especificación, "un" o "una" pueden significar uno o más. Como se usa aquí en la(s) reivindicación (se), cuando se usa junto con la palabra "que comprende", las palabras "un" o "una" pueden significar uno o más de uno.

20

[00052] El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para significar "y/o" a menos que se indique explícitamente para referirse a alternativas solamente o que las alternativas sean mutuamente excluyentes, aunque la divulgación respalda una definición que se refiere solo a alternativas y "y/o". Como 25 se usa en el presente documento, "otro" puede significar al menos un segundo o más. Los términos "cerca de ", "sustancialmente" y "aproximadamente" significan, en general, el valor indicado más o menos el 5%.

[00053] Un "trastorno inmunológico", "trastorno relacionado con el sistema inmunológico " o "trastorno mediado por el sistema inmunitario" se refiere a un trastorno en el que la respuesta inmunitaria juega un papel clave en el desarrollo o progresión de la enfermedad. Los trastornos inmunomediados
5 incluyen trastornos autoinmunitarios, rechazo de aloinjertos, enfermedad de injerto contra hospedera y afecciones inflamatorias y alérgicas.

[00054] Una "respuesta inmune" es una respuesta de una célula del sistema inmune, tal como una célula B, o una célula T, o una célula inmune innata
10 a un estímulo. En una implementación, la respuesta es específica para un antígeno particular (una "respuesta específica de antígeno").

[00055] Una "enfermedad autoinmune" se refiere a una enfermedad en la que el sistema inmune produce una respuesta inmune (por ejemplo, una
15 respuesta de células B o T) contra un antígeno que es parte de la hospedera normal (es decir, un autoantígeno), con la consiguiente lesión de los tejidos. Un autoantígeno puede derivarse de una célula hospedera o puede derivarse de un organismo comensal, como los microorganismos (conocidos como organismos comensales) que normalmente colonizan las superficies mucosas.

20

[00056] El "tratamiento" o el tratamiento de una enfermedad o afección se refiere a la ejecución de un protocolo, que puede incluir la administración de uno o más fármacos a un paciente, en un esfuerzo por aliviar los signos o síntomas de la enfermedad. Los efectos deseables del tratamiento incluyen la
25 disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, la mejora o paliación del estado de la enfermedad y la remisión o mejora del pronóstico. El alivio puede ocurrir antes que aparezcan los signos o síntomas de la enfermedad o afección, así como después de su aparición. Por tanto, "tratar" o "tratamiento" puede incluir

"prevenir" o "evitar" una enfermedad o afección indeseable. Además, "tratar" o "tratamiento" no requiere el alivio completo de los signos o síntomas, no requiere una cura y específicamente incluye protocolos que tienen solo un efecto marginal en el paciente.

5

[00057] El término "beneficio terapéutico" o "terapéuticamente eficaz" como se usa en esta solicitud se refiere a cualquier cosa que promueva o mejore el bienestar del sujeto con respecto al tratamiento médico de esta afección. Esto incluye, pero no se limita a, una reducción en la frecuencia o gravedad de los
10 signos o síntomas de una enfermedad. Por ejemplo, el tratamiento del cáncer puede implicar, por ejemplo, una reducción del tamaño de un tumor, una reducción de la capacidad de invasión de un tumor, una reducción de la tasa de crecimiento del cáncer o la prevención de la metástasis. El tratamiento del cáncer también puede referirse a prolongar la supervivencia de un sujeto con cáncer.

15

[00058] "Sujeto" y "paciente" se refieren a un ser humano o no humano, como primates, mamíferos y vertebrados. En implementaciones particulares, el sujeto es un ser humano.

20

[00059] Las frases "farmacéuticamente o farmacológicamente aceptables" se refieren a entidades y composiciones moleculares que no producen una reacción adversa, alérgica o de otro tipo cuando se administran a un animal, como un ser humano, según sea apropiado. Los versados en el arte conocerán la preparación de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o
25 ingrediente activo adicional a la luz de la presente divulgación. Además, para la administración en animales (e.g., Humanos), se entenderá que las preparaciones deben cumplir con los estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza requeridos por la Oficina de Estándares Biológicos de la FDA.

[00060] Como se usa en este documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los solventes acuosos (e.g., agua, soluciones alcohólicas/acuosas, soluciones salinas, vehículos parenterales, como cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, etc.), solventes no acuosos. (e.g., propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal y ésteres orgánicos inyectables, como etilolato), medios de dispersión, recubrimientos, tensoactivos, antioxidantes, conservantes (e.g., agentes antibacterianos o antifúngicos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes), agentes isotónicos, agentes retardadores de la absorción, sales, fármacos, estabilizadores de fármacos, geles, aglutinantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, colorantes, rellenos de fluidos y nutrientes, tales como materiales y combinaciones de los mismos, como serían conocido por un versado en el arte. El pH y la concentración exacta de los diversos componentes de una composición farmacéutica se ajustan según parámetros bien conocidos.

[00061] El término "tipificación de haplotipos o tejidos" se refiere a un método utilizado para identificar el haplotipo o tipos de tejidos de un sujeto, por ejemplo, determinando qué locus (o loci) HLA se expresa en los linfocitos de un sujeto particular. Los genes HLA se encuentran en el complejo principal de histocompatibilidad (MHC), una región en el brazo corto del cromosoma 6, y participan en la interacción célula-célula, la respuesta inmunitaria, el trasplante de órganos, el desarrollo de cáncer y la susceptibilidad a enfermedades. Hay seis loci genéticos importantes en el trasplante, denominados HLA-A, HLA-B, HLA-C y HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ. En cada locus, puede haber varios alelos diferentes.

[00062] Un método ampliamente utilizado para la haplotipificación utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para comparar el DNA del

sujeto con segmentos conocidos de los genes que codifican antígenos del MHC. La variabilidad de estas regiones de los genes determina el tipo de tejido o haplotipo del sujeto. Los métodos serológicos también se utilizan para detectar antígenos definidos serológicamente en la superficie de las células. Los determinantes HLA-A, -B y -C pueden medirse mediante técnicas serológicas conocidas. Brevemente, los linfocitos del sujeto (aislados de sangre periférica reciente) se incuban con antisueros que reconocen todos los antígenos HLA conocidos. Las células se esparcen en una bandeja con pozos microscópicos que contienen varios tipos de antisueros. Las células se incuban durante 30 minutos, seguido de una incubación adicional del complemento de 60 minutos. Si los linfocitos tienen en su superficie, antígenos reconocidos por los anticuerpos en el antisuero, los linfocitos se lisan. Se puede agregar un tinte para mostrar cambios en la permeabilidad de la membrana celular y muerte celular. El patrón de células destruidas por lisis indica el grado de incompatibilidad histológica. Si, por ejemplo, los linfocitos de una persona a la que se realiza la prueba de HLA-A3 se destruyen en un pozo que contiene antisueros para HLA-A3, la prueba es positiva para este grupo de antígenos.

[00063] El término "células presentadoras de antígenos (APC)" se refiere a una clase de células capaces de presentar uno o más antígenos en forma de un complejo péptido-MHC reconocible por células efectoras específicas del sistema inmunológico, y de ese modo inducir una efectiva respuesta celular inmune contra el antígeno o antígenos que se presentan. El término "APC" abarca células enteras intactas como macrófagos, células B, células endoteliales, células T activadas y células dendríticas, o moléculas, naturales o sintéticas capaces de presentar antígenos, tales como moléculas MHC Clase I purificadas complejadas con β 2-microglobulina.

II. Células NK

[00064] En determinadas implementaciones, las células NK se derivan de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC), productos de leucocitaféresis no estimulados (PBSC), células madre embrionarias humanas (hESC), células madre pluripotentes inducidas (iPSC), médula ósea o sangre de cordón umbilical por métodos bien conocidos en el arte. Específicamente, las células NK pueden aislarse de la sangre del cordón (CB), sangre periférica (PB), médula ósea o células madre. En implementaciones particulares, las células inmunes se aíslan de CB combinados. El CB puede agruparse a partir de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 o más unidades. Las células inmunes pueden ser autólogas o alogénicas. Las células NK aisladas pueden coincidir con el haplotipo del sujeto al que se va a administrar la terapia celular. Las células NK pueden detectarse mediante marcadores de superficie específicos, como CD16, CD56 y CD8 en humanos con ausencia de expresión de CD3.

[00065] En ciertos aspectos, la población de partida de células NK se obtiene aislando células mononucleares usando centrifugación en gradiente de densidad de ficoll. El cultivo celular puede carecer de cualquier célula que exprese células CD3, CD14 y/o CD19 y puede caracterizarse para determinar el porcentaje de células CD56⁺/CD3⁻ o células NK.

[00066] Las células se expanden en presencia de las APC presentes, como las UAPC. La expansión puede ser de aproximadamente 2 a 30 días, por ejemplo, de 3 a 20 días, particularmente de 12 a 16 días, de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19 días, específicamente de cerca de 14 días. Las células NK y APCs pueden estar presentes en una proporción de aproximadamente 3:1-1:3, tal como 2:1, 1:1, 1:2, específicamente cerca de 1:2. El cultivo de expansión puede

comprender además citoquinas para promover la expansión, tales como IL-2, IL-21 y/o IL-18. Las citoquinas pueden estar presentes en una concentración de aproximadamente 10-500 U/ml, tal como 100-300 U/ml, particularmente cerca de 200 U/ml. Las citoquinas se pueden reponer en el cultivo de expansión, por ejemplo, cada 2-3 días. Las APC se pueden agregar al cultivo al menos una segunda vez, como después de la transducción de CAR.

[00067] Después de la expansión, las células inmunes se pueden infundir inmediatamente o se pueden almacenar, por ejemplo, mediante crioconservación. En ciertos aspectos, las células pueden propagarse durante días, semanas o meses *ex vivo* como una población en masa en aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5 días.

[00068] Las células NK expandidas pueden secretar citoquinas de tipo I, tales como interferón- γ , factor de necrosis tumoral- α y factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), que activan células inmunes tanto innatas como adaptativas, así como otras citoquinas y quimioquinas. La medición de estas citoquinas se puede utilizar para determinar el estado de activación de las células NK. Además, pueden usarse otros métodos conocidos en el arte para la determinación de la activación de células NK para la caracterización de las células NK de la presente divulgación.

A. CISH

[00069] La proteína que contiene SH2 inducible por citoquinas (CIS) está codificada por el gen CISH. Este es un miembro de la familia SOCS y es una molécula de punto de control intracelular en las células NK. El CISH se induce rápidamente en respuesta a IL-15 y la delección de CISH hace que las células NK

sean hipersensibles a IL-15. Las células NK CISH desactivadas tienen una proliferación mejorada, una producción aumentada de IFN γ y una actividad citotóxica mejorada. La ablación de CIS libera un freno a la actividad de las células NK.

5

[00070] Las presentes células NK pueden tener alteración de CISH por cualquier método conocido en el arte, como por nucleasas específicas de secuencia o dirigidas, incluidas nucleasas dirigidas que se unen al DNA, como nucleasas con dedos de zinc (ZFN) y un activador de transcripción como efector
10 de nucleasas (TALEN) y nucleasas guiadas por RNA, como una nucleasa asociada a CRISPR (Cas), diseñadas específicamente para dirigirse a la secuencia del gen o una parte del mismo. En aspectos particulares, la expresión de CISH se ve interrumpida por la interrupción mediada por CRISPR.

15

B. IL-15

[00071] La interleuquina-15 (IL-15) está restringida al tejido y sólo en condiciones patológicas se observa a cualquier nivel en el suero o sistémicamente. IL-15 posee varios atributos que son deseables para la terapia
20 adoptiva. La IL-15 es una citoquina homeostática que induce el desarrollo y la proliferación celular de las células asesinas naturales, promueve la erradicación de tumores establecidos mediante el alivio de la supresión funcional de las células residentes en el tumor e inhibe la AICD.

25

[00072] En una de las implementaciones, la presente divulgación se refiere a la co-modificación de células inmunes CAR y/o TCR con IL-15. Además de IL-15, se prevén otras citoquinas. Estos incluyen, pero no se limitan a, citoquinas, quimioquinas y otras moléculas que contribuyen a la activación y

proliferación de células utilizadas para aplicaciones humanas. Las células NK o T que expresan IL-15 son capaces de señalizar citoquinas de apoyo continuo, lo que es fundamental para su supervivencia después de la infusión.

5 **[00073]** En determinadas implementaciones, se desarrollaron K562 aAPC, que expresaban el antígeno deseado (e.g., CD19) junto con moléculas coestimuladoras, como CD28, IL-15 y CD3ζ, para seleccionar células inmunes (e.g., células NK) *in vitro* que son capaces de propagación sostenida mediada por CAR. Esta poderosa tecnología permite la fabricación de números clínicamente
10 relevantes (hasta 10^{10}) de células CAR⁺ NK adecuadas para aplicaciones humanas. Según sea necesario, se pueden realizar ciclos de estimulación adicionales para generar un mayor número de células NK modificadas genéticamente. Normalmente, al menos el 90% de las células NK propagadas expresan CAR y pueden crioconservarse para infusión. Además, este enfoque se
15 puede aprovechar para generar células NK para diversos tipos de tumores emparejando la especificidad del CAR introducido con la expresión del antígeno asociado al tumor (TAA) reconocido por el CAR en la aAPC.

[00074] Después de la modificación genética, las células se pueden
20 infundir inmediatamente o se pueden almacenar. En ciertos aspectos, después de la modificación genética, las células se pueden propagar durante días, semanas o meses *ex vivo* como una población en masa dentro de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5 días o más después de la transferencia génica a las células. En un aspecto adicional, los transfectantes se clonan y un clon que demuestra la presencia de un
25 solo casete o plásmido de expresión integrado o mantenido episómicamente, y la expresión del receptor quimérico se expande *ex vivo*. El clon seleccionado para la expansión demuestra la capacidad de reconocer y lisar específicamente las células objetivo que expresan CD19. Las células inmunes recombinantes pueden

expandirse mediante estimulación con IL-2 u otras citoquinas que se unen a la cadena gamma común (e.g., IL-7, IL-12, IL-15, IL-21 y otras). Las células inmunes recombinantes pueden expandirse mediante estimulación con células presentadoras de antígenos artificiales. En un aspecto adicional, las células
5 modificadas genéticamente se pueden crioconservar.

A. Receptores de antígenos modificados genéticamente

[00075] Las células NK de la presente divulgación pueden modificarse genéticamente para expresar receptores de antígenos tales como TCR y/o CAR
10 modificados genéticamente. Por ejemplo, las células NK se modifican para expresar un TCR que tiene especificidad antigénica por un antígeno canceroso. Pueden añadirse a las células NK múltiples CAR y/o TCR, tal como, a diferentes antígenos.

15

[00076] Se conocen en el arte métodos adecuados de modificación. Ver, por ejemplo, Sambrook y Ausubel, *supra*. Por ejemplo, las células pueden transducirse para expresar un TCR que tiene especificidad antigénica por un antígeno canceroso utilizando técnicas de transducción descritas en Heemskerk *et al.*, 2008 y Johnson *et al.*, 2009.
20

[00077] La electroporación de RNA que codifica las cadenas α y β (o γ y δ) de TCR de longitud completa se puede usar como alternativa para superar los problemas a largo plazo con la autorreactividad causada por el emparejamiento de
25 las cadenas TCR transducidas retroviralmente y endógenas. Incluso si tal emparejamiento alternativo tiene lugar en la estrategia de transfección transitoria, las células T autorreactivas posiblemente generadas perderán esta autorreactividad después de algún tiempo, porque las cadenas α y β de TCR

introducidas solo se expresan de manera transitoria. Cuando la expresión de las cadenas α y β de TCR introducidas disminuye, solo quedan células T autólogas normales. Este no es el caso cuando se introducen cadenas de TCR de longitud completa mediante transducción retroviral estable, que nunca perderá las cadenas de TCR introducidas, lo que provocará una autorreactividad presente constantemente en el paciente.

[00078] En algunas implementaciones, las células comprenden uno o más ácidos nucleicos introducidos mediante ingeniería genética que codifican uno o más receptores de antígenos, y productos modificados genéticamente de dichos ácidos nucleicos. En algunas implementaciones, los ácidos nucleicos son heterólogos, i.e., normalmente no están presentes en una célula o muestra obtenida de la célula, tal como una obtenida de otro organismo o célula, que, por ejemplo, no se encuentra normalmente en la célula que se está manipulando y/o un organismo del que se deriva dicha célula. En algunas implementaciones, los ácidos nucleicos no son de ocurrencia natural, tal como un ácido nucleico que no se encuentra en la naturaleza (e.g., quimérico).

[00079] En algunas implementaciones, el CAR contiene un dominio de reconocimiento de antígeno extracelular que se une específicamente a un antígeno. En algunas implementaciones, el antígeno es una proteína expresada en la superficie de las células. En algunas implementaciones, el CAR es un CAR similar al TCR y el antígeno es un antígeno peptídico procesado, como un antígeno peptídico de una proteína intracelular, que, como un TCR, se reconoce en la superficie celular en el contexto de una molécula de complejo histocompatibilidad mayor (MHC).

[00080] Los receptores de antígenos ejemplares, incluidos los CAR y los TCR recombinantes, así como los métodos para manipular e introducir los receptores en las células, incluyen los descritos, por ejemplo, en las solicitudes de patente internacional números de publicación WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061 Números de publicación de solicitud de patente de EE.UU. US2002131960, US2013287748, US20130149337, Patentes de EE.UU. Nos.: 6,451,995, 7,446,190, 8,252,592, 8,339,645, 8,398,282, 7,446,179, 6,410,319, 7,070,995, 7,070,995, 7,265,209, 7,354,762, 7,446,191, 8,324,353 y 8,479,118, y la solicitud de patente europea número EP2537416, y/o las descritas por Sadelain *et al.*, 2013; Davila *et al.*, 2013; Turtle *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012. En algunos aspectos, los receptores de antígenos modificados genéticamente incluyen un CAR como se describe en la Patente de Estados Unidos N°: 7,446,190, y los descritos en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N°: WO/2014055668 A1.

2. Receptores de antígenos quiméricos

[00081] En algunas implementaciones, el CAR comprende: a) un dominio de señalización intracelular, b) un dominio transmembrana y c) un dominio extracelular que comprende una región de unión a antígeno.

[00082] En algunas implementaciones, los receptores de antígenos modificados incluyen CAR, incluidos los CAR activadores o estimulantes, los CAR coestimuladores (ver el documento WO2014/055668) y/o los CAR inhibidores (iCAR, ver Fedorov *et al.*, 2013). Los CAR generalmente incluyen un dominio de unión de antígeno (o ligando) extracelular unido a uno o más componentes de señalización intracelular, en algunos aspectos mediante enlazadores y/o

dominio(s) transmembrana. Dichas moléculas típicamente imitan o se aproximan a una señal a través de un receptor de antígeno natural, una señal a través de dicho receptor en combinación con un receptor coestimulador y/o una señal a través de un receptor coestimulador solo.

5

[00083] Ciertas implementaciones de la presente divulgación se refieren al uso de ácidos nucleicos, incluidos ácidos nucleicos que codifican un polipéptido CAR específico de antígeno, incluido un CAR que ha sido humanizado para reducir la inmunogenicidad (hCAR), que comprende un dominio de
10 señalización intracelular, un dominio transmembrana y un dominio extracelular que comprende uno o más motivos de señalización. En determinadas implementaciones, el CAR puede reconocer un epítipo que comprende el espacio compartido entre uno o más antígenos. En determinadas implementaciones, la región de unión puede comprender regiones determinantes de la
15 complementariedad de un anticuerpo monoclonal, regiones variables de un anticuerpo monoclonal y/o fragmentos de unión a antígeno del mismo. En otra implementación, esa especificidad se deriva de un péptido (e.g., Citoquina) que se une a un receptor.

20 **[00084]** Se contempla que los ácidos nucleicos CAR humanos pueden ser genes humanos usados para mejorar la inmunoterapia celular para pacientes humanos. En una implementación específica, la invención incluye un cDNA de CAR de longitud completa o una región codificante. Las regiones o el dominio de unión al antígeno pueden comprender un fragmento de las cadenas V_H y V_L de un
25 fragmento variable monocatenario (scFv) derivado de un anticuerpo monoclonal humano particular, como los descritos en la Patente de Estados Unidos 7,109,304, incorporada aquí como referencia. El fragmento también puede ser cualquier número de dominios de unión a antígeno diferentes de un anticuerpo específico de

antígeno humano. En una implementación más específica, el fragmento es un scFv específico de antígeno codificado por una secuencia que está optimizada para el uso de codones humanos para la expresión en células humanas.

5 **[00085]** La disposición podría ser multimérica, como un diacuerpo o multímeros. Lo más probable es que los multímeros se formen por emparejamiento cruzado de la parte variable de las cadenas ligera y pesada en un diacuerpo. La parte de bisagra del constructo puede tener múltiples alternativas desde ser totalmente eliminada, a tener la primera cisteína mantenida, a una
10 sustitución de prolina en lugar de serina, a ser truncada hasta la primera cisteína. La parte Fc se puede eliminar. Cualquier proteína que sea estable y/o dimerice puede servir para este propósito. Se podría usar solo uno de los dominios Fc, e.g., el dominio CH2 o CH3 de la inmunoglobulina humana. También se podría utilizar la bisagra, la región CH2 y CH3 de una inmunoglobulina humana que se ha
15 modificado para mejorar la dimerización. También se podría usar solo la parte de bisagra de una inmunoglobulina. También se pueden utilizar partes de CD8alpha.

[00086] En algunas implementaciones, el ácido nucleico CAR comprende una secuencia que codifica otros receptores coestimuladores, tales
20 como un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular CD28 modificado. Otros receptores coestimuladores incluyen, pero no se limitan a, uno o más de CD28, CD27, OX-40 (CD134), DAP10, DAP12 y 4-1BB (CD137). Además de una señal primaria iniciada por CD3 CD3ζ, una señal adicional proporcionada por un receptor coestimulador humano insertado en un CAR humano es
25 importante para la activación completa de las células NK y podría ayudar a mejorar la persistencia *in vivo* y el éxito terapéutico de la inmunoterapia adoptiva.

[00087] En algunas implementaciones, CAR se construye con una especificidad para un antígeno particular (o marcador o ligando), como un antígeno expresado en un tipo de célula particular para ser dirigido por terapia adoptiva, e.g., un marcador de cáncer, y/o un antígeno destinado a inducir una respuesta amortiguadora, como un antígeno expresado en un tipo de célula normal o no enferma. Por tanto, el CAR incluye típicamente en su parte extracelular una o más moléculas de unión a antígeno, tales como uno o más fragmentos, dominios o partes de unión a antígenos, o uno o más dominios variables de anticuerpo y/o moléculas de anticuerpo. En algunas implementaciones, el CAR incluye una parte de unión a antígeno o partes de una molécula de anticuerpo, como un fragmento de anticuerpo de cadena única (scFv) derivado de las cadenas pesada variable (VH) y ligera variable (VL) de un anticuerpo monoclonal (mAb).

[00088] En determinadas implementaciones del receptor de antígeno quimérico, la parte específica de antígeno del receptor (que puede denominarse dominio extracelular que comprende una región de unión a antígeno) comprende un antígeno asociado a tumor o un dominio de unión a antígeno específico de patógeno. Los antígenos incluyen antígenos de carbohidratos reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones, como Dectin-1. Un antígeno asociado a un tumor puede ser de cualquier tipo siempre que se exprese en la superficie celular de las células tumorales. Las implementaciones ejemplares de antígenos asociados a tumores incluyen ligandos CD19, CD20, CD5, CD7, CD22, CD70, CD30, BCMA, CD25, NKG2D, MICA/MICB, antígeno carcinoembrionario, alfafetoproteína, CA-125, MUC-1, CD56, EGFR, c-Met, AKT, Her2, Her3, antígeno tumoral epitelial, antígeno asociado a melanoma, p53 mutado, ras mutado, etc. En determinadas implementaciones, el CAR se puede coexpresar con una citoquina

para mejorar la persistencia cuando hay una cantidad baja de antígeno asociado al tumor. Por ejemplo, CAR puede coexpresarse con IL-15.

[00089] La secuencia del marco de lectura abierto que codifica el receptor quimérico puede obtenerse a partir de una fuente de DNA genómico, una fuente de cDNA, o puede sintetizarse (e.g., mediante PCR) o combinaciones de las mismas. Dependiendo del tamaño del DNA genómico y del número de intrones, puede ser deseable usar cDNA o una combinación de los mismos, ya que se encuentra que los intrones estabilizan el mRNA. Además, puede ser más ventajoso usar regiones no codificantes endógenas o exógenas para estabilizar el mRNA.

[00090] Se contempla que el constructo quimérico se pueda introducir en células inmunes como DNA desnudo o en un vector adecuado. Se conocen en el arte métodos de transfección estable de células mediante electroporación usando DNA desnudo. Ver, e.g., la patente de Estados Unidos No. 6,410,319. El DNA desnudo generalmente se refiere al DNA que codifica un receptor quimérico contenido en un vector de expresión de plásmido en la orientación adecuada para la expresión.

20

[00091] Alternativamente, se puede usar un vector viral (e.g., un vector retroviral, vector adenoviral, vector viral adenoasociado o vector lentiviral) para introducir el constructo quimérico en células inmunes. Los vectores adecuados para uso de acuerdo con el método de la presente divulgación no se replican en las células inmunes. Se conocen una gran cantidad de vectores basados en virus, donde el número de copias del virus mantenido en la célula es lo suficientemente bajo como para mantener la viabilidad de la célula, como, por ejemplo, vectores basados en HIV, SV40, EBV, HSV o BPV.

25

[00092] En algunos aspectos, el componente de unión o reconocimiento específico de antígeno está unido a uno o más dominios de señalización transmembrana e intracelular. En algunas implementaciones, el CAR incluye un dominio transmembrana fusionado al dominio extracelular del CAR. En una implementación, se usa el dominio transmembrana que naturalmente está asociado con uno de los dominios en el CAR. En algunos casos, el dominio transmembrana se selecciona o modifica mediante sustitución de aminoácidos para evitar la unión de dichos dominios a los dominios transmembrana de las mismas proteínas de la superficie de la membrana o de proteínas diferentes para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor.

[00093] El dominio transmembrana en algunas implementaciones se deriva de una fuente natural o sintética. Cuando la fuente es natural, el dominio en algunos aspectos se deriva de cualquier proteína unida a membrana o transmembrana. Las regiones transmembrana incluyen las derivadas de (i.e., comprenden al menos la región o regiones transmembrana de) la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 zeta, CD3 epsilon, CD3 gamma, CD3 delta, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD 16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD154, ICOS/CD278, GITR/CD357, NKG2D y moléculas DAP. Alternativamente, el dominio transmembrana en algunas implementaciones es sintético. En algunos aspectos, el dominio transmembrana sintético comprende predominantemente residuos hidrófobos tales como leucina y valina. En algunos aspectos, se encontrará un triplete de fenilalanina, triptófano y valina en cada extremo de un dominio transmembrana sintético.

25

[00094] En ciertas implementaciones, las tecnologías de plataforma descritas en este documento para modificar genéticamente células inmunes, como las células NK, comprenden (i) transferencia de genes no virales utilizando un

dispositivo de electroporación (e.g., un nucleofector), (ii) CAR que envían señales a través de endodominios (e.g., CD28/CD3- ζ , CD137/CD3- ζ u otras combinaciones), (iii) CAR con longitudes variables de dominios extracelulares que conectan el dominio de reconocimiento de antígeno a la superficie celular y, en algunos casos, (iv) células presentadoras de antígeno artificial (aAPC) derivadas de K562 para poder expandir de manera robusta y numérica las células inmunes CAR⁺ (Singh *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2011).

3. Receptor de células T (TCR)

[00095] En algunas implementaciones, los receptores de antígenos modificados genéticamente incluyen TCR recombinantes y/o TCR clonados a partir de células T de origen natural. Un "receptor de células T" o "TCR" se refiere a una molécula que contiene cadenas variables α y β (también conocidas como TCR α y TCR β , respectivamente) o cadenas variables γ y δ (también conocidas como TCR γ y TCR δ , respectivamente) y que es capaz de unirse específicamente a un péptido antigénico unido a un receptor de MHC. En algunas implementaciones, el TCR está en forma $\alpha\beta$.

[00096] Normalmente, los TCR que existen en las formas $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ son en general estructuralmente similares, pero las células T que los expresan pueden tener distintas ubicaciones o funciones anatómicas. Un TCR se puede encontrar en la superficie de una célula o en forma soluble. Generalmente, un TCR se encuentra en la superficie de las células T (o linfocitos T) donde generalmente es responsable de reconocer antígenos unidos a moléculas del complejo histocompatible mayor (MHC). En algunas implementaciones, un TCR también puede contener un dominio constante, un dominio transmembrana y/o una cola citoplasmática corta (ver, e.g., Janeway *et al.*, 1997). Por ejemplo, en algunos

aspectos, cada cadena del TCR puede poseer un dominio variable de inmunoglobulina N-terminal, un dominio constante de inmunoglobulina, una región transmembrana y una cola citoplasmática corta en el extremo C-terminal. En algunas implementaciones, un TCR se asocia con proteínas invariantes del complejo CD3 implicadas en la mediación de la transducción de señales. A menos que se indique lo contrario, el término "TCR" debe entenderse que incluye fragmentos de TCR funcionales del mismo. El término también abarca los TCR intactos o de longitud completa, incluidos los TCR en la forma $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$.

[00097] Por tanto, para los fines del presente documento, la referencia a un TCR incluye cualquier TCR o fragmento funcional, como una parte de unión a antígeno de un TCR que se une a un péptido antigénico específico unido en una molécula de MHC, i.e., complejo MHC-péptido. Una "parte de unión a antígeno" o fragmento de unión a antígeno" de un TCR, que se puede usar indistintamente, se refiere a una molécula que contiene una parte de los dominios estructurales de un TCR, pero que se une al antígeno (e.g., Complejo MHC-péptido) al que se une el TCR completo. En algunos casos, una parte de unión al antígeno contiene los dominios variables de un TCR, como la cadena α variable y la cadena β variable de un TCR, suficientes para formar un sitio de unión para unirse a un complejo específico MHC-péptido, tal como generalmente donde cada cadena contiene tres regiones determinantes de complementariedad.

[00098] En algunas implementaciones, los dominios variables de las cadenas de TCR se asocian para formar bucles, o regiones determinantes de complementariedad (CDR) análogas a las inmunoglobulinas, que confieren reconocimiento de antígenos y determinan la especificidad del péptido formando el sitio de unión de la molécula de TCR y determinan la especificidad del péptido. Normalmente, al igual que las inmunoglobulinas, las CDR están separadas por

regiones marco (FR) (Ver, e.g., Jores *et al.*, 1990; Chothia *et al.*, 1988; Lefranc *et al.*, 2003). En algunas implementaciones, CDR3 es la principal CDR responsable de reconocer el antígeno procesado, aunque también se ha demostrado que la CDR1 de la cadena alfa interactúa con la parte N-terminal del péptido antigénico, mientras que la CDR1 de la cadena beta interactúa con la parte C-terminal del péptido. Se cree que CDR2 reconoce la molécula MHC. En algunas implementaciones, la región variable de la cadena β puede contener otra región de hipervariabilidad (HV4).

[00099] En algunas implementaciones, las cadenas de TCR contienen un dominio constante. Por ejemplo, como las inmunoglobulinas, la parte extracelular de las cadenas TCR (e.g., α -cadena y β -cadena) pueden contener dos dominios de inmunoglobulina, un dominio variable (e.g., V_α o V_β típicamente los aminoácidos 1 a 116 con base en la numeración Kabat, Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 5th ed.) en el extremo N-terminal, y un dominio constante (e.g., cadena α dominio constante o C_α , típicamente los aminoácidos 117 a 259 basado en Kabat, dominio constante de cadena β o C_β , típicamente los aminoácidos 117 a 295 basado en Kabat) adyacentes a la membrana celular. Por ejemplo, en algunos casos, la parte extracelular del TCR formado por las dos cadenas contiene dos dominios constantes proximales a la membrana y dos dominios variables distales a la membrana que contienen CDR. El dominio constante del dominio TCR contiene secuencias de conexión cortas en las que un residuo de cisteína forma un enlace disulfuro, creando un enlace entre las dos cadenas. En algunas implementaciones, un TCR puede tener un residuo de cisteína adicional en cada una de las cadenas α y β , de manera que el TCR contiene dos enlaces disulfuro en los dominios constantes.

[000100] En algunas implementaciones, las cadenas de TCR pueden contener un dominio transmembrana. En algunas implementaciones, el dominio transmembrana está cargado positivamente. En algunos casos, las cadenas de TCR contienen una cola citoplásmica. En algunos casos, la estructura permite que el TCR se asocie con otras moléculas como CD3. Por ejemplo, un TCR que contiene dominios constantes con una región transmembrana puede anclar la proteína en la membrana celular y asociarse con subunidades invariantes del complejo o aparato de señalización CD3.

[000101] Generalmente, CD3 es un complejo de múltiples proteínas que puede poseer tres cadenas distintas (γ , δ y ϵ) en mamíferos y la cadena ζ . Por ejemplo, en los mamíferos, el complejo puede contener una cadena CD3 γ , una cadena CD3 δ , dos cadenas CD3 ϵ , y un homodímero de cadenas CD3 ζ . Las cadenas CD3 γ , CD3 δ y CD3 ϵ son proteínas de la superficie celular muy relacionadas de la superfamilia de inmunoglobulinas que contienen un solo dominio de inmunoglobulina. Las regiones transmembrana de las cadenas CD3 γ , CD3 δ y CD3 ϵ están cargadas negativamente, lo cual es una característica que permite que estas cadenas se asocien con las cadenas receptoras de células T cargadas positivamente. Las colas intracelulares de las cadenas CD3 γ , CD3 δ y CD3 ϵ contienen cada una un único motivo conservado conocido como motivo de activación inmunorreceptor basado en tirosina o ITAM, mientras que cada cadena CD3 ζ tiene tres. Generalmente, los ITAM están involucrados en la capacidad de señalización del complejo TCR. Estas moléculas accesorias tienen regiones transmembrana cargadas negativamente y desempeñan un papel en la propagación de la señal del TCR a la célula. Las cadenas CD3 y ζ , junto con el TCR, forman lo que se conoce como complejo receptor de células T.

[000102] En algunas implementaciones, el TCR puede ser un heterodímero de dos cadenas α y β (u opcionalmente γ y δ) o puede ser un constructo de TCR de una sola cadena. En algunas implementaciones, el TCR es un heterodímero que contiene dos cadenas separadas (cadenas α y β o cadenas γ y δ) que están unidas, tal como mediante un enlace disulfuro o enlaces disulfuro. En algunas implementaciones, se identifica un TCR para un antígeno objetivo (e.g., un antígeno canceroso) y se introduce en las células. En algunas implementaciones, el ácido nucleico que codifica el TCR puede obtenerse de una variedad de fuentes, tales como mediante la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de secuencias de DNA de TCR disponibles públicamente. En algunas implementaciones, el TCR se obtiene de una fuente biológica, tal como de células tales como de una célula T (e.g., célula T citotóxica), hibridomas de células T u otra fuente disponible públicamente. En algunas implementaciones, las células T se pueden obtener a partir de células aisladas *in vivo*. En algunas implementaciones, se puede aislar un clon de células T de alta afinidad de un paciente y aislar el TCR. En algunas implementaciones, las células T pueden ser un clon o hibridoma de células T cultivado. En algunas implementaciones, el clon de TCR para un antígeno objetivo se ha generado en ratones transgénicos diseñados con genes del sistema inmunológico humano (e.g., el sistema de antígenos leucocitarios humanos o HLA). Ver, e.g., antígenos tumorales (Ver, e.g., Parkhurst *et al.*, 2009 y Cohen *et al.*, 2005). En algunas implementaciones, la presentación de fagos se usa para aislar TCR contra un antígeno objetivo (Ver, e.g., Varela-Rohena *et al.*, 2008 y Li, 2005). En algunas implementaciones, el TCR o la parte de unión a antígeno del mismo se puede generar sintéticamente a partir del conocimiento de la secuencia del TCR.

B. Células presentadoras de antígenos

[000103] Las células presentadoras de antígenos, que incluyen macrófagos, linfocitos B y células dendríticas, se distinguen por su expresión de una molécula de MHC particular. Las APC internalizan el antígeno y reexpresan una parte de ese antígeno, junto con la molécula de MHC en su membrana celular externa. El MHC es un gran complejo genético con múltiples loci. Los loci de MHC codifican dos clases principales de moléculas de membrana de MHC, denominadas MHC de clase I y clase II. Los linfocitos T colaboradores generalmente reconocen el antígeno asociado con moléculas del MHC de clase II, y los linfocitos T citotóxicos reconocen el antígeno asociado con las moléculas del MHC de clase I. En humanos, el MHC se denomina complejo HLA y en ratones, complejo H-2.

[000104] En algunos casos, las aAPC son útiles para preparar composiciones terapéuticas y productos de terapia celular de las implementaciones. Para obtener una guía general con respecto a la preparación y el uso de sistemas presentadores de antígenos, Ver, e.g., las patentes de EE.UU. Nos. 6,225,042, 6,355,479, 6,362,001 y 6,790,662; Publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. Nos. 2009/0017000 y 2009/0004142; y Publicación Internacional No. WO2007/103009.

20

[000105] Los sistemas de aAPC pueden comprender al menos una molécula auxiliar exógena. Puede emplearse cualquier número y combinación adecuados de moléculas auxiliares. La molécula auxiliar puede seleccionarse entre moléculas auxiliares tales como moléculas coestimuladoras y moléculas de adhesión. Las moléculas coestimuladoras ejemplares incluyen CD86, CD64 (FcγRI), ligando 41BB e IL-21. Las moléculas de adhesión pueden incluir glicoproteínas de unión a carbohidratos tales como selectinas, glicoproteínas de unión a transmembrana tales como integrinas, proteínas dependientes de calcio

25

tales como cadherinas y proteínas de superfamilia de inmunoglobulinas transmembrana (Ig) de paso único, tal como moléculas de adhesión intercelular (ICAM), que promueven, por ejemplo, contacto de célula a célula o de célula a matriz. Las moléculas de adhesión ejemplares incluyen LFA-3 e ICAM, como
5 ICAM-1. Las técnicas, métodos y reactivos útiles para la selección, clonación, preparación y expresión de moléculas auxiliares ejemplares, incluidas moléculas coestimuladoras y moléculas de adhesión, se ejemplifican, e.g., en las patentes estadounidenses números 6,225,042, 6,355,479 y 6,362,001.

10 C. Antígenos

[000106] Entre los antígenos dirigidos por los receptores de antígenos modificados genéticamente se encuentran los que se expresan en el contexto de una enfermedad, afección o tipo de célula que se va a dirigir a través de la terapia
15 celular adoptiva. Entre las enfermedades y afecciones se encuentran las enfermedades y trastornos proliferativos, neoplásicos y malignos, incluidos cánceres y tumores, incluidos cánceres hematológicos, cánceres del sistema inmunológico, como linfomas, leucemias y/o mielomas, tal como leucemias B, T y mieloide, linfomas y mielomas múltiples. En algunas implementaciones, el
20 antígeno se expresa o sobre expresa selectivamente en células de la enfermedad o afección, e.g., el tumor o las células patógenas, en comparación con células o tejidos normales o no diana. En otras implementaciones, el antígeno se expresa en células normales y/o se expresa en células manipuladas.

25 [000107] Cualquier antígeno adecuado puede encontrar uso en el presente método. Los antígenos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, moléculas antigénicas de agentes infecciosos, auto-/autoantígenos, antígenos asociados a tumor-/cáncer y neoantígenos tumorales (Linnemann *et al.*, 2015). En

aspectos particulares, los antígenos incluyen NY-ESO, EGFRvIII, Muc-1, Her2, CA-125, WT-1, Mage-A3, Mage-A4, Mage-A10, TRAIL/DR4 y CEA. En aspectos particulares, los antígenos para los dos o más receptores de antígeno incluyen, pero no se limitan a, CD19, EBNA, WT1, CD123, NY-ESO, EGFRvIII, MUC1, HER2, CA-125, WT1, Mage-A3, Mage-A4, Mage-A10, TRAIL/DR4 y/o CEA. Las secuencias de estos antígenos son conocidas en el arte, por ejemplo, CD19 (No. de acceso NG_007275.1), EBNA (No. de acceso NG_002392.2), WT1 (No. de acceso NG_009272.1), CD123 (No. de acceso NC_000023.11), NY-ESO (No. de acceso NC_000023.11), EGFRvIII (No. de acceso NG_007726.3), MUC1 (No. de acceso NG_029383.1), HER2 (No. de acceso NG_007503.1), CA-125 (No. de acceso NG_055257.1), WT1 (No. de acceso NG_009272.1), Mage-A3 (No. de acceso NG_013244.1), Mage-A4 (No. de acceso NG_013245.1), Mage-A10 (No. de acceso NC_000023.11), TRAIL/DR4 (No. de acceso NC_000003.12) y/o CEA (No. de acceso NC_000019.10).

[000108] Los antígenos asociados a tumores pueden derivar de cánceres de próstata, mama, colorrectal, pulmón, páncreas, renales, mesotelioma, ovario o melanoma. Los antígenos asociados a tumores o los antígenos derivados de células tumorales ejemplares incluyen MAGE 1, 3 y MAGE 4 (u otros antígenos MAGE tales como los descritos en la publicación de patente internacional N° WO99/40188); PRAME; BAGE; RAGE, Lage (también conocido como NY ESO 1); SAGE; y HAGE o GAGE. Estos ejemplos no limitantes de antígenos tumorales se expresan en una amplia gama de tipos de tumores tales como melanoma, carcinoma de pulmón, sarcoma y carcinoma de vejiga. Ver, e.g., la patente de Estados Unidos N° 6,544,518. Los antígenos asociados a tumores de cáncer de próstata incluyen, por ejemplo, antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), antígeno específico de próstata (PSA), fosfatos de ácido prostático, NKX3.1 y antígeno epitelial de seis transmembranas de la próstata (STEAP).

[000109] Otros antígenos asociados a tumores incluyen Plu-1, HASH-1, HasH-2, Cripto y Criptin. Además, un antígeno tumoral puede ser una hormona auto-peptídica, como la hormona liberadora de hormona gonadotropina de longitud completa (GnRH), un péptido corto de 10 aminoácidos de longitud, útil en el
5 tratamiento de muchos cánceres.

[000110] Los antígenos tumorales incluyen antígenos tumorales derivados de cánceres que se caracterizan por la expresión de antígenos asociados a tumores, tales como la expresión de HER-2/neu. Los antígenos de
10 interés asociados a tumores incluyen antígenos tumorales específicos de linaje tales como los antígenos de linaje de melanoma y melanocitos MART-1/Melan-A, gp100, gp75, mda-7, tirosinasa y proteína relacionada con tirosinasa. Los antígenos asociados a tumores ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, antígenos tumorales derivados de o que comprenden uno cualquiera o más de
15 p53, Ras, c-Myc, serina/treonina quinasas citoplásmicas (e.g., quinasas dependientes de ciclina, A-Raf, B-Raf y C-Raf), MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A10, MAGE-A12, MART-1, BAGE, DAM-6, -10, GAGE-1, -2, -8, GAGE-3, -4, -5, -6, -7B, NA88-A, MART-1, MC1R, Gp100, PSA, PSM, Tirosinasa, TRP-1, TRP-2, ART-4, CAMEL, CEA, Cyp-B, hTERT, hTRT,
20 iCE, MUC1, MUC2, Fosfoinositido 3-quinasa (PI3K), receptores TRK, PRAME, P15, RU1, RU2, SART-1, SART-3, antígeno tumoral de Wilms (WT1), AFP, catenina/m, caspasa-8/m, CEA, CDK-4/m, ELF2M, GnT-V, G250, HSP70-2M, HST-2, KIAA0205, MUM-1, MUM-2, MUM-3, Miosina/m, RAGE, SART-2, TRP-2/INT2, 707-AP, Anexina II, CDC27/m, TPI/mbcr-abl, BCR-ABL, factor 4 regulador
25 de interferón (IRF4), ETV6/AML, LDLR/FUT, Pml/RAR, transductor 1 de señal de calcio asociado a tumor (TACSTD1) TACSTD2, receptor de tirosina quinasas (e.g., receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (en particular, EGFRvIII), receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), receptor del

factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR)), tirosina quinasas citoplasmáticas (e.g., familia src, familia syk-ZAP70), quinasas ligadas a integrinas (ILK), transductores de señal y activadores de la transcripción STAT3, STATS y STATE, factores inducibles por hipoxia (e.g., HIF-1 y HIF-2), factor nuclear Kappa B (NF-B), receptores Notch (e.g., Notch1-4), c-Met, dianas de rapamicina en mamíferos (mTOR), WNT, quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) y sus subunidades reguladoras, PMSA, PR-3, MDM2, mesotelina, carcinoma de células renales-5T4, SM22-alfa, anhidrasas carbónicas I (CAI) y IX (CAIX) (también conocidas como G250), STEAD, TEL/AML1, GD2, proteinasa3, hTERT, puntos de corte de translocación de sarcoma, EphA2, ML-IAP, EpCAM, ERG (gen de fusión TMPRSS2 ETS), NA17, PAX3, ALK, receptor de andrógenos, ciclina B1, ácido polisialico, MYCN, RhoC, GD3, fucosil GM1, mesoteliano, PSCA, sLe, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, GLoboh, NY-BR-1, RGS SART3, STn, PAX5, OY-TES1, proteína de esperma 17, LCK, HMWMAA, AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, legumain, TIE2, Page4, MAD-CT-1, FAP, MAD-CT-2, antígeno 1relacionado a fos, CBX2, CLDN6, SPANX, TPTE, ACTL8, ANKRD30A, CDKN2A, MAD2L1, CTAG1B, SUNC1, LRRN1 e idiotipo.

[000111] Los antígenos pueden incluir regiones epitópicas o péptidos epitópicos derivados de genes mutados en células tumorales o de genes transcritos a diferentes niveles en células tumorales en comparación con células normales, tales como enzima telomerasa, survivina, mesotelina, ras mutado, reordenamiento bcr/abl, Her2/neu, p53 mutado o de tipo salvaje, citocromo P450 1B1, y secuencias de intrones expresadas de forma anormal tales como N-acetilglucosaminiltransferasa-V; reordenamientos clonales de genes de inmunoglobulina que generan idiotipos únicos en mieloma y linfomas de células B; antígenos tumorales que incluyen regiones epitópicas o péptidos epitópicos derivados de procesos oncovirales, tales como las proteínas E6 y E7 del virus del

papiloma humano; Proteína LMP2 del virus Epstein Barr; proteínas oncofetales no mutadas con expresión selectiva de tumores, como el antígeno carcinoembrionario y la alfa-fetoproteína.

5 **[000112]** En otras implementaciones, un antígeno se obtiene o se deriva de un microorganismo patógeno o de un microorganismo patógeno oportunista (también llamado en este documento microorganismo de enfermedad infecciosa), tal como un virus, hongo, parásito y bacteria. En determinadas formas de implementación, los antígenos derivados de dicho microorganismo incluyen
10 proteínas de longitud completa.

[000113] Los organismos patógenos ilustrativos cuyos antígenos se contemplan para uso en el método descrito en este documento incluyen virus de inmunodeficiencia humana (HIV), virus del herpes simple (HSV), virus sincitial
15 respiratorio (RSV), citomegalovirus (CMV), virus de Epstein-Barr (EBV)), Influenza A, B y C, virus de la estomatitis vesicular (VSV), virus de la estomatitis vesicular (VSV), poliomavirus (e.g., Virus BK y virus JC), adenovirus, especies de *Staphylococcus*, incluido *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), y Especies de *Streptococcus*, incluido *Streptococcus pneumoniae*. Como entenderá
20 el versado en el arte, las proteínas derivadas de estos y otros microorganismos patógenos para uso como antígeno como se describe en el presente documento y las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas pueden identificarse en publicaciones y en bases de datos públicas tales como GENBANK®, SWISS-PROT® y TREMBL®.

25

[000114] Los antígenos derivados del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) incluyen cualquiera de las proteínas estructurales del virión del HIV

(e.g., gp120, gp41, p17, p24), proteasa, transcriptasa inversa o proteínas del HIV codificadas por tat, rev, nef, vif, vpr y vpu.

[000115] Los antígenos derivados del virus del herpes simple (e.g., HSV 1 y HSV2) incluyen, pero no se limitan a, proteínas expresadas a partir de genes tardíos de HSV. El grupo tardío de genes codifica predominantemente proteínas que forman la partícula del virión. Tales proteínas incluyen las cinco proteínas de (UL) que forman la cápside viral: UL6, UL18, UL35, UL38 y la proteína de la cápside principal UL19, UL45 y UL27, cada una de las cuales se puede usar como un antígeno como se describe en este documento. Otras proteínas ilustrativas de HSV contempladas para uso como antígenos en la presente incluyen las proteínas ICP27 (H1, H2), glicoproteína B (gB) y glicoproteína D (gD). El genoma del HSV comprende al menos 74 genes, cada uno de los cuales codifica una proteína que podría usarse potencialmente como antígeno.

[000116] Los antígenos derivados del citomegalovirus (CMV) incluyen proteínas estructurales de CMV, antígenos virales expresados durante las fases tempranas e inmediatas de la replicación del virus, glicoproteínas I y III, proteína de la cápside, proteína de la cubierta, proteína de matriz inferior pp65 (ppUL83), p52 (ppUL44), IE1 y 1E2 (UL123 y UL122), productos proteicos del grupo de genes de UL128-UL150 (Rykman, *et al.*, 2006), glicoproteína de envoltura B (gB), gH, gN y pp150. Como entenderá el versado en el arte, las proteínas de CMV para uso como antígenos descritos en este documento pueden identificarse en bases de datos públicas como GENBANK®, SWISS-PROT® y TREMBL® (Ver, e.g., Bennekov *et al.*, 2004; Loewendorf *et al.*, 2010; Marschall *et al.*, 2009).

[000117] Los antígenos derivados del virus de Epstein-Ban (EBV) que se contemplan para uso en determinadas implementaciones incluyen proteínas

líticas de EBV gp350 y gp110, proteínas de EBV producidas durante la infección del ciclo latente que incluyen el antígeno nuclear de Epstein-Ban (EBNA)-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C, proteína líder de EBNA (EBNA-LP) y proteínas de membrana latente (LMP)-1, LMP-2A y LMP-2B (Ver, e.g., Lockey *et al.*, 2008).

[000118] Los antígenos derivados del virus respiratorio sincitial (RSV) que se contempla para uso en la presente incluyen cualquiera de las once proteínas codificadas por el genoma del RSV, o fragmentos antigénicos de las mismas: NS 1, NS2, N (proteína de la nucleocápside), M (proteína de matriz) SH, G y F (proteínas de la cubierta viral), M2 (segunda proteína de la matriz), M2-1 (factor de elongación), M2-2 (regulación de la transcripción), RNA polimerasa y fosfoproteína P.

[000119] contempla para uso incluyen cualquiera de las cinco proteínas principales codificadas por el genoma del VSV, y fragmentos antigénicos de las mismas: proteína grande (L), glicoproteína (G), nucleoproteína (N), fosfoproteína (P) y proteína de matriz (M) (Ver, e.g., Rieder *et al.*, 1999).

[000120] Los antígenos derivados de un virus de la influenza que se contempla para uso en ciertas implementaciones incluyen hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), nucleoproteína (NP), proteínas de matriz M1 y M2, NS1, NS2 (NEP), PA, PB1, PB1-F2 y PB2.

[000121] Los antígenos virales ejemplares también incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de adenovirus, polipéptidos de alfavirus, polipéptidos de calicivirus (e.g., un antígeno de la cápside de calicivirus), polipéptidos de coronavirus, polipéptidos del virus del moquillo, polipéptidos del virus del Ébola,

polipéptidos de enterovirus, polipéptidos de flavivirus, polipéptidos del virus de la hepatitis. (AE) (un antígeno central o de superficie de la hepatitis B, una glucoproteína E1 o E2 del virus de la hepatitis C, proteínas centrales o no estructurales), polipéptidos del virus del herpes (incluido un virus del herpes simple
5 o una glucoproteína del virus de la varicela zoster), polipéptidos del virus de la peritonitis infecciosa, polipéptidos del virus de la leucemia, polipéptidos del virus de Marburg, polipéptidos de ortomixovirus, polipéptidos del virus del papiloma, polipéptidos del virus de la parainfluenza (e.g., los polipéptidos de hemaglutinina y neuraminidasa), polipéptidos de paramixovirus, polipéptidos de parvovirus,
10 polipéptidos de pestivirus, polipéptidos del picornavirus (e.g., un polipéptido de la cápside del poliovirus), polipéptidos del virus de la viruela(e.g., in polipéptido de la vacuna del virus)polipéptido del virus de la rabia (e.g., una glicoproteína G del virus de la rabia), polipéptidos de reovirus, polipéptidos de retrovirus y polipéptidos de rotavirus.

15

[000122] En determinadas formas de implementación, el antígeno puede ser antígenos bacterianos. En determinadas implementaciones, un antígeno bacteriano de interés puede ser un polipéptido secretado. En otras determinadas implementaciones, los antígenos bacterianos incluyen antígenos
20 que tienen una parte o partes del polipéptido expuestas en la superficie celular externa de la bacteria.

[000123] Los antígenos derivados de especies de *Staphylococcus* que incluyen *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) que se contemplan
25 para uso incluyen reguladores de virulencia, tales como el sistema Agr, Sar y Sae, el sistema Arl, homólogos de Sar (Rot, MgrA, SarS, SarR, SarT, SarU, SarV, SarX, SarZ y TcaR), el sistema Srr y TRAP. Otras proteínas de *Staphylococcus* que pueden servir como antígenos incluyen proteínas Clp, HtrA, MsrR, aconitasa,

CcpA, SvrA, Msa, CfvA y CfvB (Ver, e.g., *Staphylococcus*: Molecular Genetics, 2008 Caister Academic Press, Ed. Jodi Lindsay). Los genomas de dos especies de *Staphylococcus aureus* (N315 y Mu50) se han secuenciado y están disponibles públicamente, por ejemplo, en PATRIC (PATRIC: The VBI PathoSystems Resource Integration Center, Snyder *et al.*, 2007). Como entenderá el versado en el arte, las proteínas de *Staphylococcus* para uso como antígenos también pueden identificarse en otras bases de datos públicas tales como GenBank®, Swiss-Prot® y TrEMBL®.

[000124] Los antígenos derivados de *Streptococcus pneumoniae* que se contemplan para uso en determinadas implementaciones descritas en el presente documento incluyen neumolisina, PspA, proteína A de unión a colina (CbpA), NanA, NanB, SpnHL, PavA, LytA, Pht y proteínas pilina (RrgA; RrgB; RrgC). Las proteínas antigénicas de *Streptococcus pneumoniae* también se conocen en el arte y pueden usarse como antígeno en algunas implementaciones (Ver, e.g., Zysk *et al.*, 2000). Se ha secuenciado la secuencia completa del genoma de una cepa virulenta de *Streptococcus pneumoniae* y, como comprenderá el versado en el arte, las proteínas de *S. pneumoniae* para uso en el presente documento también pueden identificarse en otras bases de datos públicas como GENBANK®, SWISS-PROT®, y TREMBL®. Las proteínas de particular interés para los antígenos según la presente divulgación incluyen factores de virulencia y proteínas que se predice que estarán expuestas en la superficie de los neumococos (Ver, e.g., Frolet *et al.*, 2010).

[000125] Los ejemplos de antígenos bacterianos que pueden usarse como antígenos incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de *Actinomyces*, polipéptidos de *Bacillus*, polipéptidos de *Bacteroides*, polipéptidos de *Bordetella*, polipéptidos de *Bartonella*, polipéptidos de *Borrelia* (e.g., *B. burgdorferi* OspA),

polipéptidos de *Brucella* Polipéptidos de *Campylobacter*, polipéptidos de *Capnocytophaga*, polipéptidos de *Chlamydia*, polipéptidos de *Corynebacterium*, polipéptidos de *Coxiella*, polipéptidos de *Dermatophilus*, polipéptidos de *Enterococcus*, polipéptidos de *Ehrlichia*, polipéptidos de *Escherichia*, polipéptidos de *Francisella*, polipéptidos de *Fusobacterium*, polipéptidos de *Haemobartonella*, polipéptido de *Haemophilus* (e.g., proteína de la membrana externa de *H. influenzae*, tipo b) , polipéptidos de *Helicobacter*, polipéptidos de *Klebsiella*, polipéptidos de bacterias en forma de L, polipéptidos de *Leptospira*, polipéptidos de *Listeria*, polipéptidos de *Mycobacteria*, polipéptidos de *Mycoplasma*, polipéptidos de *Neisseria*, polipéptidos de *Neorickettsia*, polipéptidos de *Nocardia*, polipéptidos de *Pasteurella*, polipéptidos de *Peptococcus*, polipéptidos de *Peptostreptococcus*, polipéptidos de *Pneumococcus* (i.e., polipéptidos de *S. pneumoniae*) (ver descripción en este documento), polipéptidos de *Proteus*, polipéptidos de *Pseudomonas*, polipéptidos de *Rickettsia*, polipéptidos de *Rochalimaea*, polipéptidos de *Salmonella*, polipéptidos de *Shigella*, polipéptidos de *Staphylococcus*, polipéptidos de *estreptococcus* del grupo A (e.g. proteínas M de *S. pyogenes*), polipéptidos de *estreptococcus* del grupo B (*S. Agalactiae*), polipéptidos de *Treponema* y polipéptidos de *Yersinia* (e.g. antígenos F1 y V de *Y. pestis*).

[000126] Los ejemplos de antígenos fúngicos incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de *Absidia*, polipéptidos de *Acremonium*, polipéptidos de *Alternaria*, polipéptidos de *Aspergillus*, polipéptidos de *Basidiobolus*, polipéptidos de *Bipolaris*, polipéptidos de *Blastomyces*, polipéptidos de *Candida*, polipéptidos de *Coccidioides*, polipéptidos de *Conidiobolus*, polipéptidos de *Cryptococcus*, polipéptidos de *Curvalaria*, polipéptidos de *Epidermophyton*, polipéptidos de *Exophiala*, polipéptidos de *Geotrichum*, polipéptidos de *Histoplasma*, polipéptidos de *Madurella*, polipéptidos de *Malassezia*, polipéptidos de *Microsporum*,

polipéptidos de *Moniliella*, polipéptidos de *Mortierella*, polipéptidos del *Mucor*, polipéptidos de *Paecilomyces*, polipéptidos de *Penicillium*, polipéptidos *Phialemonium*, polipéptidos de *Phialophora*, polipéptidos de *Prototheca*, polipéptidos de *Pseudallescheria*, polipéptidos de *Pseudomicrodochium*,
 5 polipéptidos de *Pythium*, polipéptidos de *Rhinosporidium*, polipéptidos de *Rhizopus*, polipéptidos de *Scolecobasidium*, polipéptidos de *Sporothrix*, polipéptidos de *Stemphylium*, polipéptidos de *Trichophyton*, polipéptidos de *Trichosporon* y polipéptidos de *Xylohypha*.

10 **[000127]** Los ejemplos de antígenos del parásito protozario incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de *Babesia*, Polipéptidos de *Balantidium* Polipéptidos de *Besnoitia*, Polipéptidos de *Cryptosporidium*, Polipéptidos de *Eimeria*, Polipéptidos de *Encephalitozoon*, Polipéptidos de *Entamoeba*, Polipéptidos de *Giardia*, Polipéptidos de *Hammondia*, Polipéptidos de
 15 *Hepatozoon*, Polipéptidos de *Isospora*, Polipéptidos de *Leishmania*, Polipéptidos de *Microsporidia*, Polipéptidos de *Neospora*, Polipéptidos de *Nosema*, Polipéptidos de *Pentatrichomonas*, Polipéptidos de *Plasmodium*, Los ejemplos de parasitos helminth incluyen pero no se limitan a,, Polipéptidos de *Acanthocheilonema*, Polipéptidos de *Aelurostrongylus*, Polipéptidos de
 20 *Ancylostoma*, Polipéptidos de *Angiostrongylus*, Polipéptidos de *Ascaris*, Polipéptidos de *Brugia*, Polipéptidos de *Bunostomum*, Polipéptidos de *Capillaria*, Polipéptidos de *Chabertia*, Polipéptidos de *Cooperia*, Polipéptidos de *Crenosoma*, Polipéptidos de *Dictyocaulus*, Polipéptidos de *Diectophyme*, Polipéptidos de *Dipetalonema*, Polipéptidos de *Diphylobothrium*, Polipéptidos de *Diplydium*,
 25 Polipéptidos de *Dirofilaria*, Polipéptidos de *Dracunculus*, Polipéptidos de *Enterobius*, Polipéptidos de *Filaroides*, Polipéptidos de *Haemonchus*, Polipéptidos de *Lagochilascaris*, Polipéptidos de *Loa*, Polipéptidos de *Mansonella*, Polipéptidos de *Muellerius*, Polipéptidos de *Nanophyetus*, Polipéptidos de *Necator*,

Polipéptidos de *Nematodirus*, Polipéptidos de *Oesophagostomum*, Polipéptidos de *Onchocerca*, Polipéptidos de *Opisthorchis*, Polipéptidos de *Ostertagia*, Polipéptidos de *Parafilaria*, Polipéptidos de *Paragonimus*, Polipéptidos de *Parascaris*, Polipéptidos de *Physaloptera*, Polipéptidos de *Protostrongylus*,
 5 Polipéptidos de *Setaria*, Polipéptidos de *Spirocerca*, Polipéptidos de *Spirometra*, Polipéptidos de *Stephanofilaria*, Polipéptidos de *Strongyloides*, Polipéptidos de *Strongylus*, Polipéptidos de *Theilaria*, Polipéptidos de *Toxascaris*, Polipéptidos de *Toxocara*, Polipéptidos de *Trichinella*, Polipéptidos de *Trichostrongylus*, Polipéptidos de *Trichuris*, Polipéptidos de *Uncinaria* y polipéptidos de
 10 *Wuchereria*. (e.g., *P. falciparum circumsporozoite* (PfCSP)), proteína 2 de superficie de sporozoite (PfSSP2), carboxilo terminal del antígeno 1 del estado hepático (PfLSA 1 c-term), y proteína 1 exportada (PfExp-1), polipetidos de *Pneumocystis*, Polipéptidos de *Sarcocystis*, Polipéptidos de *Schistosoma*, Polipéptidos de *Theileria*, Polipéptidos de *Toxoplasma* y Polipéptidos de
 15 *Trypanosoma*.

[000128] Los ejemplos de antígenos de ectoparásitos incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos (que incluyen antígenos así como alérgenos) de pulgas; garrapatas, incluidas garrapatas duras y blandas; moscas, como mosquitos,
 20 zancudos, moscas de la arena, moscas negras, moscas de caballo, moscas de los cuernos, moscas de los ciervos, moscas tsetsé, moscas de los establos, moscas que causan miasis y mosquitos picadores; hormigas; arañas, piojos; ácaros y chinches verdaderos, como chinches de cama y chinches besos.

25 **D. Genes suicidas**

[000129] El CAR de las células inmunes de la presente divulgación puede comprender uno o más genes suicidas. El término "gen suicida", como se

usa en este documento, se define como un gen que, tras la administración de un profármaco, efectúa la transición de un producto génico a un compuesto que destruye su célula hospedera. Ejemplos de combinaciones de gen suicida/profármaco que pueden usarse son virus del herpes simplex-timidina quinasa (HSV-tk) y ganciclovir, aciclovir o FIAU; oxidorreductasa y cicloheximida; citosina desaminasa y 5-fluorocitosina; timidina quinasa timidilato quinasa (Tdk::Tmk) y AZT; y desoxicitidina quinasa y citosina arabinósido.

[000130] La purina nucleósido fosforilasa de E. coli, un gen denominado suicida que convierte el profármaco 6-metilpurina desoxirribósido en purina tóxica 6-metilpurina. Otros ejemplos de genes suicidas utilizados con la terapia de profármacos son el gen de la citosina desaminasa de E. coli y el gen de la timidina quinasa del HSV.

[000131] Los genes suicidas ejemplares incluyen CD20, CD52, EGFRv3 o caspasa inducible 9. En una implementación, se puede usar una versión truncada de la variante III de EGFR (EGFRv3) como un antígeno suicida que puede eliminarse mediante Cetuximab. Otros genes suicidas conocidos en el arte que pueden usarse en la presente divulgación incluyen purina nucleósido fosforilasa (PNP), enzimas del citocromo p450 (CYP), carboxipeptidasas (CP), carboxilesterasa (CE), nitroreductasa (NTR), guanina ribosiltransferasa (XGRTP), Enzimas glucosidasa, metionina- α , γ -liasa (MET) y timidina fosforilasa (TP).

E. Métodos de entrega

[000132] Un versado en el arte estaría bien equipado para construir un vector mediante técnicas recombinantes estándar (Por ejemplo, Sambrook *et al.*, 2001 y Ausubel *et al.*, 1996, ambos incorporados aquí como referencia) para la

expresión de los receptores de antígenos de la presente divulgación. Los vectores incluyen, entre otros, plásmidos, cósmidos, virus (bacteriófagos, virus animales y virus vegetales) y cromosomas artificiales (e.g., YAC), tales como vectores retrovirales (e.g., Derivados de vectores del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV), MSCV, SFFV, MPSV, SNV, etc.), vectores lentivirales (e.g., derivados de HIV-1, HIV-2, SIV, BIV, FIV, etc.), vectores adenovirales (Ad) que incluyen replicación competente, replicación deficiente y formas dependientes de ayudador (gutless) de los mismos de los mismos, adeno vectores virales asociados (AAV), vectores del virus simio 40 (SV-40), vectores del virus del papiloma bovino, vectores del virus de Epstein-Barr, vectores del virus del herpes, vectores del virus de la vacuna, vectores del virus del sarcoma murino de Harvey, vectores del virus del tumor mamario murino, vectores del virus del sarcoma Rous, vectores del parvovirus, vectores del virus de la polio, vectores del virus de la estomatitis vesicular, vectores del virus maraba y vectores enadenotucirev del adenovirus del grupo B.

a. Vectores virales

[000133] Se pueden proporcionar vectores virales que codifican un receptor de antígeno en ciertos aspectos de la presente divulgación. Al generar vectores virales recombinantes, los genes no esenciales se reemplazan típicamente con un gen o secuencia codificante de una proteína heteróloga (o no nativa). Un vector viral es un tipo de construcción de expresión que utiliza secuencias virales para introducir ácido nucleico y posiblemente proteínas en una célula. La capacidad de ciertos virus para infectar células o ingresar a las células a través de endocitosis mediada por receptores, y para integrarse en los genomas de la célula hospedera y expresar genes virales de manera estable y eficiente los ha convertido en candidatos atractivos para la transferencia de ácidos nucleicos

extraños a las células (e.g., Células de mamíferos). A continuación, se describen ejemplos no limitantes de vectores de virus que pueden usarse para administrar un ácido nucleico de ciertos aspectos de la presente invención.

5 **[000134]** Los lentivirus son retrovirus complejos que, además de los genes retrovirales comunes *gag*, *pol* y *env*, contienen otros genes con función reguladora o estructural. Los vectores lentivirales son bien conocidos en el arte (ver, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 6,013,516 y 5,994,136).

10 **[000135]** Los vectores lentivirales recombinantes son capaces de infectar células que no se dividen y pueden usarse para la transferencia de genes y la expresión de secuencias de ácido nucleico tanto *in vivo* como *ex vivo*. Por ejemplo, el lentivirus recombinante capaz de infectar una célula que no se divide, en el que una célula hospedera adecuada se transfecta con dos o más vectores
15 que llevan las funciones de empaquetamiento, a saber, *gag*, *pol* y *env*, así como *rev* y *tat*, se describe en la patente de EE.UU. 5,994,136, incorporada aquí como referencia.

b. Elementos regulatorios

20

[000136] Los casetes de expresión incluidos en los vectores útiles en la presente divulgación en particular contienen (en una dirección 5' a 3') un promotor transcripcional eucariota operativamente ligado a una secuencia codificante de proteína, señales de empalme que incluyen secuencias intermedias y una
25 secuencia de terminación transcripcional/poliadenilación. Los promotores y potenciadores que controlan la transcripción de genes que codifican proteínas en células eucariotas están compuestos por múltiples elementos genéticos. La maquinaria celular es capaz de recopilar e integrar la información reguladora

transmitida por cada elemento, lo que permite que diferentes genes desarrollen patrones distintos, a menudo complejos, de regulación transcripcional. Un promotor usado en el contexto de la presente divulgación incluye promotores constitutivos, inducibles y específicos de tejido.

5

(i) Promotor/Potenciadores

[000137] Los constructos de expresión proporcionados en el presente documento comprenden un promotor para impulsar la expresión del receptor de antígeno. Un promotor generalmente comprende una secuencia que funciona para posicionar el sitio de inicio para la síntesis de RNA. El ejemplo más conocido de esto es la caja TATA, pero en algunos promotores que carecen de una caja TATA, como, por ejemplo, el promotor del gen de la desoxinucleotidil transferasa terminal de mamífero y el promotor de los genes tardíos de SV40, un elemento discreto que se superpone al inicio. El sitio mismo ayuda a fijar el lugar de iniciación. Los elementos promotores adicionales regulan la frecuencia de inicio de la transcripción. Normalmente, estos se encuentran en la región 30110 bp cadena arriba del sitio de inicio, aunque se ha demostrado que varios promotores contienen elementos funcionales también cadena abajo del sitio de inicio. Para llevar una secuencia codificante "bajo el control de" un promotor, se coloca el extremo 5' del sitio de inicio de la transcripción del marco de lectura transcripcional "cadena abajo" de (i.e., 3' de) el promotor elegido. El promotor "corriente arriba" estimula la transcripción del DNA y promueve la expresión del RNA codificado.

25

[000138] El espaciamiento entre elementos promotores es frecuentemente flexible, de modo que la función del promotor se conserva cuando los elementos se invierten o se mueven entre sí. En el promotor tk, el

espaciamiento entre los elementos del promotor se puede incrementar a 50 bp antes que la actividad comience a disminuir. Dependiendo del promotor, parece que los elementos individuales pueden funcionar de forma cooperativa o independiente para activar la transcripción. Un promotor puede o no usarse junto con un "potenciador", que se refiere a una secuencia reguladora que actúa en cis implicada en la activación transcripcional de una secuencia de ácido nucleico.

[000139] Un promotor puede ser uno asociado naturalmente con una secuencia de ácido nucleico, como puede obtenerse aislando las secuencias no codificantes 5' ubicada cadena arriba del segmento codificante y/o exón. Dicho promotor puede denominarse "endógeno". De manera similar, un potenciador puede ser uno naturalmente asociado con una secuencia de ácido nucleico, ubicado cadena abajo o cadena arriba de esa secuencia. Alternativamente, se obtendrán ciertas ventajas colocando el segmento de ácido nucleico codificante bajo el control de un promotor recombinante o heterólogo, que se refiere a un promotor que normalmente no está asociado con una secuencia de ácido nucleico en su entorno natural. Un potenciador recombinante o heterólogo también se refiere a un potenciador que normalmente no está asociado con una secuencia de ácido nucleico en su entorno natural. Dichos promotores o potenciadores pueden incluir promotores o potenciadores de otros genes, y promotores o potenciadores aislados de cualquier otro virus, o célula procariota o eucariota, y promotores o potenciadores que no "ocurren naturalmente", i.e., que contienen diferentes elementos de diferentes regiones reguladoras de la transcripción y/o mutaciones que alteran la expresión. Por ejemplo, los promotores que se utilizan con mayor frecuencia en el constructo de DNA recombinante incluyen los sistemas de promotores de β -lactamasa (penicilinasa), lactosa y triptófano (trp). Además de producir secuencias de ácido nucleico de promotores y potenciadores de forma sintética, las secuencias se pueden producir usando clonación recombinante y/o

tecnología de amplificación de ácido nucleico, incluyendo PCR™, en conexión con las composiciones descritas en este documento. Además, se contempla que las secuencias de control que dirigen la transcripción y/o expresión de secuencias dentro de organelos no nucleares tales como mitocondrias, cloroplastos y
5 similares, también se pueden emplear.

[000140] Naturalmente, será importante emplear un promotor y/o potenciador que dirija eficazmente la expresión del segmento de DNA en el organelo, tipo celular, tejido, órgano u organismo elegido para la expresión. Los
10 versados en el arte de la biología molecular generalmente conocen el uso de promotores, potenciadores y combinaciones de tipos de células para la expresión de proteínas (Ver, por ejemplo, Sambrook *et al.* 1989, incorporado aquí como referencia). Los promotores empleados pueden ser constitutivos, específicos de tejido, inducibles y/o útiles en las condiciones apropiadas para dirigir un alto nivel
15 de expresión del segmento de DNA introducido, tal como es ventajoso en la producción a gran escala de proteínas y/o péptidos recombinantes. El promotor puede ser heterólogo o endógeno.

[000141] Además, cualquier combinación de promotor/potenciador
20 (según, por ejemplo, la Base de datos de promotores eucarióticos EPDB, a través de la red mundial en epd.isb-sib.ch/) también podría usarse para impulsar la expresión. El uso de un sistema de expresión citoplásmico T3, T7 o SP6 es otra posible implementación. Las células eucariotas pueden soportar la transcripción citoplasmática de ciertos promotores bacterianos si se proporciona la polimerasa
25 bacteriana apropiada, ya sea como parte del complejo de administración o como un constructo adicional de expresión genética.

[000142] Los ejemplos no limitantes de promotores incluyen promotores virales tempranos o tardíos, tales como promotores tempranos o tardíos de SV40, promotores tempranos inmediatos de citomegalovirus (CMV), promotores tempranos del virus del sarcoma de Rous (RSV); promotores de células eucariotas, tales como, e.g., promotor de beta actina, promotor de GADPH, promotor de metalotioneína; y promotores de elementos de respuesta concatenados, tales como promotores de elementos de respuesta de AMP cíclicos (cre), promotores de elementos de respuesta de suero (sre), promotores de ésteres de forbol (TPA) y promotores de elementos de respuesta (tre) cerca de una caja TATA mínima. También es posible utilizar secuencias promotoras de la hormona del crecimiento humana (e.g., El promotor mínimo de la hormona del crecimiento humana descrito en Genbank, No. de acceso X05244, nucleótido 283-341) o un promotor de tumor mamario de ratón (disponible en la ATCC, No. de cat. ATCC 45007). En determinadas implementaciones, el promotor es CMV IE, dectina-1, dectina-2, CD11c humana, F4/80, SM22, RSV, SV40, Ad MLP, beta-actina, promotor de MHC de clase I o MHC de clase II, sin embargo, cualquier otro promotor que sea útil para impulsar la expresión del gen terapéutico es aplicable a la práctica de la presente divulgación.

[000143] En ciertos aspectos, los métodos de la divulgación también se refieren a secuencias potenciadoras, i.e., secuencias de ácidos nucleicos que aumentan la actividad de un promotor y que tienen el potencial de actuar en cis, e independientemente de su orientación, incluso a distancias relativamente largas (hasta varias kilobases lejos del promotor objetivo). Sin embargo, la función del potenciador no está necesariamente restringida a distancias tan largas, ya que también pueden funcionar muy cerca de un promotor dado.

(ii) Señales de iniciación y expresión enlazada

[000144] También se puede usar una señal de iniciación específica en la expresión de los constructos proporcionadas en la presente divulgación para la traducción eficaz de secuencias codificantes. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG o secuencias adyacentes. Puede ser necesario proporcionar señales de control de la traducción exógena, incluido el codón de iniciación ATG. Un versado en el arte sería capaz de determinar fácilmente esto y proporcionar las señales necesarias. Es bien sabido que el codón de iniciación debe estar "en marco" con el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para asegurar la traducción del inserto completo. Las señales de control de la traducción exógenas y los codones de iniciación pueden ser naturales o sintéticos. La eficacia de la expresión se puede mejorar mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados.

[000145] En determinadas implementaciones, el uso de elementos de sitios de entrada de ribosomas internos (IRES) se usa para crear mensajes multigénicos o policistrónicos. Los elementos IRES pueden eludir el modelo de exploración de ribosomas de la traducción dependiente de Cap 5' metilada y comenzar la traducción en sitios internos. Se han descrito elementos IRES de dos miembros de la familia de los picornavirus (polio y encefalomiocarditis), así como un mensaje IRES de un mamífero. Los elementos IRES se pueden vincular a marcos de lectura abiertos heterólogos. Se pueden transcribir juntos múltiples marcos de lectura abiertos, cada uno separado por un IRES, creando mensajes policistrónicos. En virtud del elemento IRES, cada marco de lectura abierto es accesible a los ribosomas para una traducción eficiente. Se pueden expresar de manera eficiente múltiples genes usando un solo promotor/potenciador para transcribir un solo mensaje.

[000146] Además, ciertos elementos de la secuencia 2A podrían usarse para crear genes enlazados o coexpresión en los constructos proporcionados en la presente divulgación. Por ejemplo, las secuencias de escisión podrían usarse para coexpresar genes uniendo marcos de lectura abiertos para formar un solo

5 cistrón. Una secuencia de escisión ejemplar es la F2A (virus 2A de la enfermedad de la fiebre aftosa) o una secuencia "similar a 2A" (e.g., virus 2A de Tosea asigna; T2A).

(iii) Orígenes de la replicación

10 Para propagar un vector en una célula hospedera, puede contener uno o más orígenes de sitios de replicación (a menudo denominados "ori"), por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico correspondiente a oriP de EBV como se describió anteriormente o un oriP modificado genéticamente con una función similar o elevada en la programación, que es una secuencia de ácido nucleico específica en

15 la que se inicia la replicación. Alternativamente, se puede emplear un origen de replicación de otro virus que se replica extracromosómicamente como se describió anteriormente o una secuencia de replicación autónoma (ARS)

c. Selección y Tamizaje de Marcadores

20

[000147] En algunas implementaciones, las células que contienen un constructo de la presente divulgación pueden identificarse *in vitro* o *in vivo* mediante la inclusión de un marcador en el vector de expresión. Dichos marcadores conferirían un cambio identificable a la célula permitiendo una fácil

25 identificación de las células que contienen el vector de expresión. Generalmente, un marcador de selección es aquel que confiere una propiedad que permite la selección. Un marcador de selección positivo es aquel en el que la presencia del marcador permite su selección, mientras que un marcador de selección negativo

es aquel en el que su presencia impide su selección. Un ejemplo de marcador de selección positivo es un marcador de resistencia a fármacos.

[000148] Normalmente, la inclusión de un marcador de selección de fármacos ayuda en la clonación e identificación de transformantes, por ejemplo, genes que confieren resistencia a neomicina, puromicina, higromicina, DHFR, GPT, zeocina e histidinol son marcadores de selección útiles. Además de los marcadores que confieren un fenotipo que permite la discriminación de transformantes en función de la implementación de condiciones, también se contemplan otros tipos de marcadores que incluyen marcadores tamizables como GFP, cuya base es el análisis colorimétrico. Alternativamente, se pueden utilizar enzimas detectables como marcadores de selección negativa tales como timidina quinasa (tk) del virus del herpes simple o cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). Un versado en el arte también sabría cómo emplear marcadores inmunológicos, posiblemente junto con el análisis FACS. No se cree que el marcador utilizado sea importante, siempre que sea capaz de expresarse simultáneamente con el ácido nucleico que codifica un producto génico. Los versados en el arte conocen bien otros ejemplos de marcadores de selección y tamizado.

d. Otros métodos de suministro de ácido nucleico

[000149] Además del suministro viral de los ácidos nucleicos que codifican el receptor de antígeno, los siguientes son métodos adicionales de suministros de genes recombinantes a una célula hospedera dada y, por tanto, se consideran en la presente divulgación.

[000150] La introducción de un ácido nucleico, como DNA o RNA, en las células inmunes de la divulgación actual puede usar cualquier método

adecuado para el suministro de ácido nucleico para la transformación de una célula, como se describe en este documento o como sería conocido por alguien de ordinario versado en el arte. Dichos métodos incluyen, pero no se limitan a, suministro directo de DNA tal como por transfección *ex vivo*, por inyección, 5 incluyendo microinyección; por electroporación; por precipitación con fosfato de calcio; usando DEAE-dextrano seguido de polietilenglicol; por carga sónica directa; por transfección mediada por liposomas y transfección mediada por receptor; por bombardeo de microproyectiles; por agitación con fibras de carburo de silicio; por transformación mediada por *Agrobacterium*; por absorción de DNA mediada por 10 desecación/inhibición, y cualquier combinación de tales métodos. Mediante la aplicación de técnicas como éstas, los organelos, células, tejidos u organismos pueden transformarse de forma estable o transitoria.

F. Modificación de la expresión genética

15

[000151] En algunas implementaciones, las células inmunes de la presente divulgación se modifican para tener una expresión alterada de **CISH**. En implementaciones adicionales, las células pueden modificarse adicionalmente para alterar la expresión del receptor de glucocorticoides y/o receptor de TGF β 20 (e.g., TGF β -RII). En una implementación, las células inmunes pueden modificarse para expresar un receptor II de TGF β negativo dominante (TGF β RIIDN) que puede funcionar como un sumidero de citoquinas para agotar el TGF β endógeno.

[000152] En algunas implementaciones, la expresión génica alterada se 25 lleva a cabo efectuando una alteración en el gen, tal como una mutación de desactivación, inserción, sentido erróneo o cambio de marco, tal como mutación bialélica de cambio de marco, delección de todo o parte del gen, e.g., uno o más exones o partes de los mismos, y/o desactivación. Por ejemplo, la expresión

génica alterada puede efectuarse mediante nucleasas específicas de secuencia o dirigidas, incluidas nucleasas dirigidas que se unen al DNA, como nucleasas con dedos de zinc (ZFN) y nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN), y nucleasas guiadas por RNA como una nucleasa asociada a CRISPR (Cas), diseñada específicamente para dirigirse a la secuencia del gen o una parte del mismo.

[000153] En algunas implementaciones, la alteración de la expresión, actividad y/o función del gen se lleva a cabo al alterar el gen. En algunos aspectos, el gen se modifica para que su expresión se reduzca al menos en o aproximadamente un 20, 30 o 40%, generalmente al menos en o aproximadamente un 50, 60, 70, 80, 90 o 95% en comparación con la expresión en ausencia de la modificación del gen o en ausencia de los componentes introducidos para efectuar la modificación.

15

[000154] En algunas implementaciones, la alteración es transitoria o reversible, de modo que la expresión del gen se restaura en un momento posterior. En otras implementaciones, la alteración no es reversible o transitoria, e.g., es permanente.

20

[000155] En algunas implementaciones, la alteración génica se lleva a cabo mediante la inducción de una o más rupturas bicatenarias y/o una o más rupturas monocatenarias en el gen, típicamente de una manera dirigida. En algunas implementaciones, las rupturas de cadena doble o monocatenaria se realizan mediante una nucleasa, e.g., una endonucleasa, como una nucleasa dirigida a un gen. En algunos aspectos, las rupturas se inducen en la región codificante del gen, e.g., en un exón. Por ejemplo, en algunas implementaciones,

25

la inducción se produce cerca de la parte N-terminal de la región de codificación, e.g., en el primer exón, en el segundo exón o en un exón posterior.

[000156] En algunos aspectos, las roturas bicatenarias o monocatenarias se reparan mediante un proceso de reparación celular, como por unión de extremos no homólogos (NHEJ) o reparación dirigida por homología (HDR). En algunos aspectos, el proceso de reparación es propenso a errores y da como resultado la alteración del gen, como una mutación de cambio de marco, por ejemplo, una mutación de cambio de marco bialélico, que puede resultar en la desactivación completa del gen. Por ejemplo, en algunos aspectos, la interrupción comprende inducir una deleción, mutación y/o inserción. En algunas implementaciones, la interrupción da como resultado la presencia de un codón de terminación temprano. En algunos aspectos, la presencia de una inserción, deleción, translocación, mutación de cambio de marco y/o un codón de parada prematuro da como resultado la interrupción de la expresión, actividad y/o función del gen.

[000157] En algunas implementaciones, la alteración génica se logra usando técnicas antisentido, tales como por interferencia de RNA (RNAi), RNA de corto de interferencia (siRNA), horquilla corta (shRNA) y/o ribozimas se usan para suprimir o reprimir selectivamente la expresión del gen. La tecnología de siRNA es RNAi que emplea una molécula de RNA de doble hebra que tiene una secuencia homóloga con la secuencia de nucleótidos del mRNA que se transcribe a partir del gen, y una secuencia complementaria con la secuencia de nucleótidos. El siRNA generalmente es homólogo/complementario con una región de mRNA que se transcribe del gen, o puede ser siRNA que incluye una pluralidad de moléculas de RNA que son homólogas/complementarias con diferentes regiones. En algunos aspectos, el siRNA está comprendido en un constructo policistrónico.

1. ZFP y ZFN

[000158] En algunas implementaciones, la molécula de dirección de DNA incluye una proteína de unión a DNA tal como una o más proteínas de dedo de zinc (ZFP) o proteína de tipo activador de la transcripción (TAL), fusionada a una proteína efectora tal como una endonucleasa. Los ejemplos incluyen las ZFN, TALE y TALEN.

[000159] En algunas implementaciones, la molécula de dirección de DNA comprende una o más proteínas con dedos de zinc (ZFP) o dominios de las mismas que se unen al DNA de una manera de secuencia específica. Una ZFP o dominio de la misma es una proteína o dominio dentro de una proteína más grande que se une al DNA de una manera de secuencia específica a través de uno o más dedos de zinc, regiones de la secuencia de aminoácidos dentro del dominio de unión cuya estructura se estabiliza mediante la coordinación de un ion de zinc. El término proteína de unión al DNA con dedos de zinc a menudo se abrevia como proteína con dedos de zinc o ZFP. Entre las ZFP se encuentran dominios de ZFP artificiales que se dirigen a secuencias de DNA específicas, típicamente de 9-18 nucleótidos de longitud, generadas por ensamblaje de dedos individuales.

[000160] Las ZFP incluyen aquellas en las que un solo dominio de dedo tiene aproximadamente 30 aminoácidos de longitud y contiene una hélice alfa que contiene dos residuos de histidina invariantes coordinados a través del zinc con dos cisteínas de una sola vuelta beta, y que tienen dos, tres, cuatro, cinco, o seis dedos. En general, la especificidad de secuencia de una ZFP puede alterarse haciendo sustituciones de aminoácidos en las cuatro posiciones de la hélice (-1, 2, 3 y 6) en una hélice de reconocimiento de dedos de zinc. Por tanto, en algunas

implementaciones, la ZFP o la molécula que contiene ZFP no se produce de forma natural, e.g., está diseñada para unirse a un sitio objetivo de elección.

[000161] En algunas implementaciones, la molécula de dirección de DNA es o comprende un dominio de unión a DNA con dedos de zinc fusionado a un dominio de escisión de DNA para formar una nucleasa con dedos de zinc (ZFN). En algunas implementaciones, las proteínas de fusión comprenden el dominio de escisión (o semidominio de escisión) de al menos una enzima de restricción de Tipo II y uno o más dominios de unión a dedos de zinc, que pueden o no pueden ser modificados por ingeniería genética. En algunas implementaciones, el dominio de escisión es de la endonucleasa de restricción de Tipo II Fok I. Fok I generalmente cataliza la escisión bicatenaria del DNA, a 9 nucleótidos de su sitio de reconocimiento en una hebra y 13 nucleótidos de su sitio de reconocimiento en la otra.

[000162] Se encuentran disponibles comercialmente muchos dedos de zinc modificados genéticamente por ingeniería genética. Por ejemplo, Sangamo Biosciences (Richmond, CA, EE. UU.) Ha desarrollado una plataforma (CompoZr) para el constructo con dedos de zinc en asociación con Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.), Lo que permite a los investigadores evitar el constructo y validación con dedos de zinc juntos y proporciona dedos de zinc específicamente dirigidos a miles de proteínas (Gaj *et al.*, Trends in Biotechnology, 2013, 31 (7), 397-405). En algunas implementaciones, se utilizan dedos de zinc disponibles comercialmente o se diseñan a medida. (Consulte, por ejemplo, los números de catálogo de Sigma-Aldrich CSTZFND, CSTZFN, CTil-IKT y PZD0020).

2. TAL, TALE y TALEN

[000163] En algunas implementaciones, la molécula de direccionamiento de DNA comprende un dominio de unión al DNA de una proteína de tipo activador de la transcripción (TAL) que se produce de forma natural o modificada (no de origen natural), como en una proteína efectora de una proteína de tipo activador de la transcripción (TALE). Ver, e.g., la publicación de patente de EE.UU. No. 2011/0301073, incorporada por referencia en su totalidad en la presente.

[000164] Un dominio de unión a DNA de TALE o TALE es un polipéptido que comprende uno o más dominios/unidades de repetición de TALE. Los dominios repetidos están implicados en la unión de TALE a su secuencia de DNA objetivo afín. Una única "unidad de repetición" (también denominada "repetición") tiene típicamente 33-35 aminoácidos de longitud y exhibe al menos alguna homología de secuencia con otras secuencias de repetición de TALE dentro de una proteína TALE de origen natural. Cada unidad de repetición de TALE incluye 1 o 2 residuos de unión al DNA que forman el Diresiduo variable de repetición (RVD), típicamente en las posiciones 12 y/o 13 de la repetición. El código natural (canónico) para el reconocimiento del DNA de estos TALE se ha determinado de manera que una secuencia de HD en las posiciones 12 y 13 conduce a una unión a la citosina (C), NG se une a T, NI a A, NN se une a G o A, y NO se une a T y también se conocen RVD no canónicos (atípicos). En algunas implementaciones, los TALE pueden dirigirse a cualquier gen mediante el diseño de matrices TAL con especificidad para la secuencia de DNA diana. La secuencia objetivo generalmente comienza con una timidina.

[000165] En algunas implementaciones, la molécula es una endonucleasa de unión a DNA, tal como una nucleasa TALE (TALEN). En algunos aspectos, TALEN es una proteína de fusión que comprende un dominio de unión a

DNA derivado de un TALE y un dominio catalítico de nucleasa para escindir una secuencia objetivo de ácido nucleico.

[000166] En algunas implementaciones, TALEN reconoce y escinde la
5 secuencia objetivo en el gen. En algunos aspectos, la escisión del DNA da como
resultado roturas bicatenarias. En algunos aspectos, las rupturas estimulan la tasa
de recombinación homóloga o unión de extremos no homólogos (NHEJ).
Generalmente, NHEJ es un proceso de reparación imperfecto que a menudo
resulta en cambios en la secuencia de DNA en el sitio de la escisión. En algunos
10 aspectos, los mecanismos de reparación implican volver a unir lo que queda de los
dos extremos del DNA a través de la ligadura directa o mediante la denominada
unión de extremos mediada por microhomología. En algunas implementaciones, la
reparación a través de NHEJ da como resultado pequeñas inserciones o
deleciones y se puede usar para interrumpir y así reprimir el gen. En algunas
15 implementaciones, la modificación puede ser una sustitución, deleción o adición
de al menos un nucleótido. En algunos aspectos, las células en las que ha
ocurrido un evento de mutagénesis inducida por escisión, es decir, un evento de
mutagénesis consecutivo a un evento de NHEJ, pueden identificarse y/o
seleccionarse mediante métodos bien conocidos en el arte.

[000167] En algunas implementaciones, las repeticiones de TALE se
ensamblan para apuntar específicamente a un gen. (Gaj *et al.*, 2013). Se ha
construido una biblioteca de TALEN que se dirige a 18.740 genes codificadores de
proteínas humanas (Kim *et al.*, 2013). Las matrices TALE diseñadas a medida
25 están disponibles comercialmente a través de Collectis Bioresearch (París,
Francia), Transposagen Biopharmaceuticals (Lexington, KY, EE. UU.) Y Life
Technologies (Grand Island, NY, EE. UU.). Específicamente, los TALEN que se
dirigen a CD38 están disponibles comercialmente (consulte Gencopoeia, números

de catálogo HTN222870-1, HTN222870-2 y HTN222870-3). Se describen moléculas ejemplares, e.g., en las publicaciones de patente de EE.UU. Nos. US 2014/0120622 y 2013/0315884.

5 **[000168]** En algunas implementaciones, los TALEN se introducen como genes trans codificados por uno o más vectores plásmidos. En algunos aspectos, el vector plásmido puede contener un marcador de selección que proporciona la identificación y/o selección de células que recibieron dicho vector.

10 **3. RGEN (sistemas CRISPR/Cas)**

[000169] En algunas implementaciones, la alteración se lleva a cabo utilizando uno o más ácidos nucleicos que se unen al DNA, como la alteración mediante una endonucleasa guiada por RNA (RGEN). Por ejemplo, la alteración
15 se puede llevar a cabo utilizando repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas (CRISPR) y proteínas asociadas a CRISPR (Cas). En general, "sistema CRISPR" se refiere colectivamente a las transcripciones y otros elementos implicados en la expresión o dirección de la actividad de genes asociados a CRISPR ("Cas"), incluidas las secuencias que codifican un gen Cas,
20 una secuencia tracr (CRISPR trans-activante) (e.g., tracrRNA o un tracrRNA parcial activo), una secuencia tracr-pareja (que abarca una "repetición directa" y una repetición directa parcial procesada con tracrRNA en el contexto de un sistema CRISPR endógeno), una secuencia guía (también denominada "espaciador" en el contexto de un sistema CRISPR endógeno) y/u otras
25 secuencias y transcripciones de un locus CRISPR.

[000170] La nucleasa CRISPR/Cas o el sistema nucleasa CRISPR/Cas puede incluir una molécula de RNA no codificante (guía) RNA, cuya secuencia se

5 une específicamente al DNA, y una proteína Cas (e.g., Cas9), con funcionalidad nucleasa (e.g., dos dominios nucleasa). Uno o más elementos de un sistema CRISPR pueden derivar de un sistema CRISPR de tipo I, tipo II o tipo III, e.g., derivado de un organismo particular que comprende un sistema CRISPR endógeno, como *Streptococcus pyogenes*.

10 **[000171]** En algunos aspectos, se introducen en la célula una nucleasa Cas y un gRNA (que incluye una fusión de crNRA específico para la secuencia objetivo y tracrRNA fijo). En general, los sitios objetivo en el extremo 5' del gRNA objetivo dirigen la nucleasa Cas al sitio diana, e.g., el gen, usando apareamiento de bases complementarias. El sitio objetivo puede seleccionarse basándose en su ubicación inmediatamente 5' de una secuencia de motivo adyacente protoespaciador (PAM), tal como normalmente NGG o NAG. A este respecto, el gRNA se dirige a la secuencia deseada modificando los primeros 20, 19, 18, 17, 15 16, 15, 14, 14, 12, 11 o 10 nucleótidos del RNA guía para que correspondan con la secuencia de DNA diana. En general, un sistema CRISPR se caracteriza por elementos que promueven la formación de un complejo CRISPR en el sitio de una secuencia diana. Normalmente, "secuencia diana" generalmente se refiere a una secuencia para la cual se diseña una secuencia guía para que tenga 20 complementariedad, donde la hibridación entre la secuencia objetivo y una secuencia guía promueve la formación de un complejo CRISPR. No se requiere necesariamente una completa complementariedad, siempre que haya suficiente complementariedad para provocar la hibridación y promover la formación de un complejo CRISPR.

25

20 **[000172]** El sistema CRISPR puede inducir roturas bicatenarias (DSB) en el sitio objetivo, seguidas de interrupciones o alteraciones como se describe en el presente documento. En otras implementaciones, las variantes de Cas9,

consideradas "nickasas", se utilizan para cortar una sola hebra en el sitio objetivo. Se pueden usar nickasas emparejadas, e.g., para mejorar la especificidad, cada una dirigida por un par de secuencias de dirección de gRNA diferentes de modo que tras la introducción de las muescas simultáneamente, se introduzca un saliente 5'. En otras implementaciones, Cas9 catalíticamente inactivo se fusiona con un dominio efector heterólogo tal como un represor o activador transcripcional, para afectar la expresión génica.

[000173] La secuencia objetivo puede comprender cualquier polinucleótido, tal como polinucleótidos de DNA o RNA. La secuencia objetivo puede estar ubicada en el núcleo o el citoplasma de la célula, como dentro de un organelo de la célula. Generalmente, una secuencia o molde que se puede usar para la recombinación en el locus objetivo que comprende las secuencias objetivo se denomina "plantilla de edición" o "polinucleótido de edición" o "secuencia de edición". En algunos aspectos, un polinucleótido molde exógeno puede denominarse molde de edición. En algunos aspectos, la recombinación es una recombinación homóloga.

[000174] Normalmente, en el contexto de un sistema CRISPR endógeno, la formación del complejo CRISPR (que comprende la secuencia guía hibridada con la secuencia objetivo y complejada con una o más proteínas Cas) da como resultado la escisión de una o ambas cadenas en o cerca de (e.g., dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50 o más pares de bases de) la secuencia objetivo. La secuencia tracr, que puede comprender o consistir en la totalidad o una parte de una secuencia tracr de tipo salvaje (e.g., aproximadamente o más de aproximadamente 20, 26, 32, 45, 48, 54, 63, 67, 85 o más nucleótidos de una secuencia de tracr de tipo salvaje), también puede formar parte del complejo CRISPR, tal como por hibridación a lo largo de al menos una parte de la secuencia

de tracr con toda o una parte de una secuencia de tracr pareja que está operativamente unida a la secuencia guía. La secuencia tracr tiene suficiente complementariedad con una secuencia tracr pareja para hibridar y participar en la formación del complejo CRISPR, como al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%
5 o 99% de complementariedad de secuencia a lo largo de la longitud de la secuencia tracr pareja cuando se alinea de manera óptima.

[000175] Se pueden introducir en la célula uno o más vectores que dirigen la expresión de uno o más elementos del sistema CRISPR de manera que
10 la expresión de los elementos del sistema CRISPR dirija la formación del complejo CRISPR en uno o más sitios diana. Los componentes también se pueden administrar a las células como proteínas y/o RNA. Por ejemplo, una enzima Cas, una secuencia guía unida a una secuencia tracr-pareja y una secuencia tracr podrían estar unidas operativamente a elementos reguladores separados en
15 vectores separados. Alternativamente, dos o más de los elementos expresados a partir de los mismos o diferentes elementos reguladores, pueden combinarse en un solo vector, con uno o más vectores adicionales proporcionando cualquier componente del sistema CRISPR no incluido en el primer vector. El vector puede comprender uno o más sitios de inserción, como una secuencia de reconocimiento
20 de endonucleasa de restricción (también denominada "sitio de clonación"). En algunas implementaciones, uno o más sitios de inserción están ubicados corriente arriba y/o corriente abajo de uno o más elementos de secuencia de uno o más vectores. Cuando se usan múltiples secuencia guía diferentes, se puede usar un constructo de expresión única para dirigir la actividad CRISPR para múltiples
25 secuencias objetivo correspondientes diferentes dentro de una célula.

[000176] Un vector puede comprender un elemento regulador unido operativamente a una secuencia codificante de enzima que codifica la enzima

CRISPR, tal como una proteína Cas. Los ejemplos no limitantes de proteínas Cas incluyen Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (también conocida como Csn1 y Csx12), Cas10, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, homólogos de los mismos o versiones modificadas de los mismos. Estas enzimas son conocidas; por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la proteína Cas9 de *S. pyogenes* puede encontrarse en la base de datos SwissProt con el número de acceso Q99ZW2.

[000177] La enzima CRISPR puede ser Cas9 (e.g., de *S. pyogenes* o *S. neumonia*). La enzima CRISPR puede dirigir la escisión de una o ambas cadenas en la ubicación de una secuencia diana, como dentro de la secuencia objetivo y/o dentro del complemento de la secuencia diana. El vector puede codificar una enzima CRISPR que está mutada con respecto a una enzima de tipo salvaje correspondiente, de manera que la enzima CRISPR mutada carece de la capacidad de escindir una o ambas cadenas de un polinucleótido objetivo que contiene una secuencia diana. Por ejemplo, una sustitución de aspartato a alanina (D10A) en el dominio catalítico RuvC I de Cas9 de *S. pyogenes* convierte Cas9 de una nucleasa que escinde ambas hebras en una nickasa (escinde una sola hebra). En algunas implementaciones, se puede usar una nickasa Cas9 en combinación con secuencia(s) guía, e.g., dos secuencias guía, que se dirigen respectivamente a las hebras sentido y antisentido del DNA diana. Esta combinación permite cortar ambas hebras y usarlas para inducir NHEJ o HDR.

[000178] En algunas implementaciones, una secuencia codificante de enzima que codifica la enzima CRISPR tiene un codón optimizado para la expresión en células particulares, tales como células eucariotas. Las células

eucariotas pueden ser las de un organismo particular o derivarse de él, tal como un mamífero, que incluyen, pero no se limitan a humanos, ratones, ratas, conejos, perros o primates no humanos. En general, la optimización de codones se refiere a un proceso de modificación de una secuencia de ácido nucleico para mejorar la

5 expresión en las células hospedadoras de interés reemplazando al menos un codón de la secuencia nativa con codones que se usan con mayor frecuencia o con la mayor frecuencia en los genes de ese hospedador celular mientras se mantiene la secuencia de aminoácidos nativa. Varias especies exhiben un sesgo particular para ciertos codones de un aminoácido particular. El sesgo de codones

10 (diferencias en el uso de codones entre organismos) a menudo se correlaciona con la eficiencia de traducción del RNA mensajero (mRNA), que a su vez se cree que depende, entre otras cosas, de las propiedades de los codones que se traducen y de la disponibilidad de Transferir moléculas de RNA (tRNA). El predominio de tRNA seleccionados en una célula es generalmente un reflejo de

15 los codones usados con más frecuencia en la síntesis de péptidos. En consecuencia, los genes se pueden adaptar para una expresión génica óptima en un organismo dado basándose en la optimización de codones.

[000179] En general, una secuencia guía es cualquier secuencia

20 polinucleotídica que tenga suficiente complementariedad con una secuencia polinucleotídica objetivo para hibridar con la secuencia objetivo y la unión directa específica de secuencia del complejo CRISPR a la secuencia diana. En algunas implementaciones, el grado de complementariedad entre una secuencia guía y su secuencia objetivo correspondiente, cuando se alinea de manera óptima usando

25 un algoritmo de alineación adecuado, es aproximadamente o más de aproximadamente 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97,5%, 99% o más.

[000180] Las secuencias de gRNA ejemplares para NR3CS (receptor de glucocorticoides) incluyen Ex3 NR3C1 sG1 5-TGC TGT TGA GGA GCT GGA-3 (SEQ ID NO: 1) y Ex3 NR3C1 sG2 5-AGC ACA CCA GGC AGA GTT-3 (SEQ ID NO: 2). Ejemplos de secuencias de gRNA para el receptor 2 de TGF-beta incluyen

5 EX3 TGFBR2 sG1 5-CGG CTG AGG AGC GGA AGA-3 (SEQ ID NO: 3) y EX3 TGFBR2 sG2 5-TGG-AGG-TGA-GCA-ATC-CCC-3 (SEQ ID NO: 4). El promotor de T7, la secuencia objetivo y la secuencia de solapamiento pueden tener la secuencia TTAATACGACTCACTATAGG (SEQ ID NO: 5) + secuencia objetivo + gtttagagctagaaatagc (SEQ ID NO: 6).

10

[000181] La alineación óptima se puede determinar con el uso de cualquier algoritmo adecuado para alinear secuencias, cuyo ejemplo no limitante incluye el algoritmo Smith-Waterman, el algoritmo Needleman-Wunsch, algoritmos basados en la transformada de Burrows-Wheeler (e.g., Burrows Wheeler Aligner),

15 Clustal W, Clustal X, BLAT, Novoalign (Novocraft Technologies, ELAND (Illumina, San Diego, California), SOAP (disponible en soap.genomics.org.cn) y Maq (disponible en maq.sourceforge.net).

[000182] La enzima CRISPR puede ser parte de una proteína de fusión

20 que comprende uno o más dominios proteicos heterólogos. Una proteína de fusión de enzima CRISPR puede comprender cualquier secuencia de proteína adicional y, opcionalmente, una secuencia enlazadora entre dos dominios cualquiera. Los ejemplos de dominios de proteínas que pueden fusionarse con una enzima CRISPR incluyen, sin limitación, etiquetas de epítipo, secuencias de genes

25 indicadores y dominios de proteínas que tienen una o más de las siguientes actividades: actividad de metilasa, actividad de desmetilasa, actividad de activación de la transcripción, actividad de represión de la transcripción, actividad del factor de liberación de la transcripción, actividad de modificación de histonas,

actividad de escisión del RNA y actividad de unión de ácidos nucleicos. Los ejemplos no limitantes de etiquetas de epítipo incluyen etiquetas de histidina (His), etiquetas V5, etiquetas FLAG, etiquetas de hemaglutinina (HA) de influenza, etiquetas Myc, etiquetas VSV-G y etiquetas de tiorredoxina (Trx). Los ejemplos de genes indicadores incluyen, pero no se limitan a, glutatión-5-transferasa (GST), peroxidasa de rábano picante (HRP), cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) beta galactosidasa, beta-glucuronidasa, luciferasa, proteína verde fluorescente (GFP), HcRed, DsRed, proteína fluorescente cian (CFP), proteína fluorescente amarilla (YFP) y proteínas autofluorescentes, incluida la proteína fluorescente azul (BFP).

Una enzima CRISPR puede fusionarse con una secuencia genética que codifica una proteína o un fragmento de una proteína que se une a moléculas de DNA o se une a otras moléculas celulares, incluidas, entre otras, la proteína de unión a maltosa (MBP), etiqueta S, dominio de unión de DNA Lex A (DBD), fusiones del dominio de unión al DNA GAL4A y fusiones de la proteína BP16 del virus del herpes simple (HSV). Los dominios adicionales que pueden formar parte de una proteína de fusión que comprenden una enzima CRISPR se describen en el documento US 20110059502, incorporado aquí como referencia.

III. Métodos de tratamiento

[000183] En algunas implementaciones, la presente divulgación proporciona métodos para inmunoterapia que comprenden administrar una cantidad eficaz de las células NK de la presente divulgación. En una implementación, una enfermedad o trastorno médico se trata mediante la transferencia de una población de células NK que provoca una respuesta inmunitaria. En determinadas implementaciones de la presente divulgación, el cáncer o la infección se tratan mediante la transferencia de una población de células NK que provoca una respuesta inmunitaria. En el presente documento se

proporcionan métodos para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo que comprenden administrar al individuo una cantidad eficaz de una terapia celular específica de antígeno. Los presentes métodos pueden aplicarse para el tratamiento de trastornos inmunitarios, cánceres sólidos, cánceres
5 hematológicos e infecciones virales.

[000184] Los tumores para los que son útiles los presentes métodos de tratamiento incluyen cualquier tipo de células malignas, como las que se encuentran en un tumor sólido o un tumor hematológico. Los tumores sólidos
10 ejemplares pueden incluir, pero no se limitan a, un tumor de un órgano seleccionado del grupo que consiste en páncreas, colon, ciego, estómago, cerebro, cabeza, cuello, ovario, riñón, laringe, sarcoma, pulmón, vejiga, melanoma, próstata y mama. Los tumores hematológicos ejemplares incluyen tumores de la médula ósea, neoplasias malignas de células T o B, leucemias,
15 linfomas, blastomas, mielomas y similares. Otros ejemplos de cánceres que pueden tratarse utilizando los métodos proporcionados en este documento incluyen, pero no se limitan a, cáncer de pulmón (incluido cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón), cáncer del peritoneo, cáncer gástrico
20 o de estómago (incluyendo cáncer gastrointestinal y cáncer de estroma gastrointestinal), cáncer de páncreas, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándula salival, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, varios
25 tipos de cáncer de cabeza y cuello y melanoma.

[000185] El cáncer puede ser específicamente del siguiente tipo histológico, aunque no se limita a estos: neoplasma, maligno; carcinoma;

carcinoma, indiferenciado; carcinoma de células gigantes y fusiformes; carcinoma de células pequeñas; carcinoma papilar; carcinoma de células escamosas; carcinoma linfoepitelial; carcinoma de células basales; carcinoma pilomatrix; carcinoma de células de transición; carcinoma de células de transición papilar;

5 adenocarcinoma; gastrinoma maligno; colangiocarcinoma; carcinoma hepatocelular; carcinoma hepatocelular y colangiocarcinoma combinados; adenocarcinoma trabecular; carcinoma adenoide quístico; adenocarcinoma en pólipo adenomatoso; adenocarcinoma, poliposis coli familiar; carcinoma sólido; tumor carcinoide, maligno; adenocarcinoma branquiolo-alveolar; adenocarcinoma

10 papilar; carcinoma cromóforo; carcinoma acidófilo; adenocarcinoma oxifílico; carcinoma de basófilos; adenocarcinoma de células claras; carcinoma de células granulares; adenocarcinoma folicular; adenocarcinoma papilar y folicular; carcinoma esclerosante no encapsulante; carcinoma cortical suprarrenal; carcinoma endometroide; carcinoma de apéndice cutáneo; adenocarcinoma

15 apocrino; adenocarcinoma sebáceo; adenocarcinoma ceruminoso; carcinoma mucoepidermoide; cistadenocarcinoma; cistadenocarcinoma papilar; cistadenocarcinoma seroso papilar; cistadenocarcinoma mucinoso; adenocarcinoma mucinoso; carcinoma de células en anillo de sello; carcinoma de conducto infiltrante; carcinoma medular; carcinoma lobulillar; carcinoma

20 inflamatorio; enfermedad de Paget, mamaria; carcinoma de células acinares; carcinoma adenoescamoso; adenocarcinoma con/metaplasia escamosa; timoma, maligno; tumor del estroma ovárico, maligno; thecoma, maligno; tumor de células granulosas, maligno; androblastoma maligno; carcinoma de células de Sertoli; tumor de células de Leydig, maligno; tumor de células lipídicas, maligno;

25 paraganglioma, maligno; paraganglioma extramamario, maligno; feocromocitoma; glomangiosarcoma; melanoma maligno; melanoma amelanótico; melanoma de extensión superficial; melanoma lentigo maligno; melanomas lentiginosos acrales; melanomas nodulares; melanoma maligno en nevo pigmentado gigante;

melanoma de células epitelioides; nevo azul, maligno; sarcoma; fibrosarcoma; histiocitoma fibroso, maligno; mixosarcoma; liposarcoma; leiomiosarcoma; rabdomiosarcoma; rabdomiosarcoma embrionario; rabdomiosarcoma alveolar; sarcoma estromal; tumor mixto, maligno; tumor mixto mulleriano; nefroblastoma; 5 hepatoblastoma; carcinosarcoma; mesenquimoma maligno; tumor de Brenner, maligno; tumor phyllodes, maligno; sarcoma sinovial; mesotelioma maligno; disgerminoma; carcinoma embrionario; teratoma maligno; struma ovarii, maligno; coriocarcinoma; mesonefoma, maligno; hemangiosarcoma; hemangioendotelioma maligno; sarcoma de Kaposi; hemangiopericitoma maligno; linfangiosarcoma; 10 osteosarcoma; osteosarcoma yuxtacortical; condrosarcoma; condroblastoma maligno; condrosarcoma mesenquimatoso; tumor óseo de células gigantes; sarcoma de Ewing; tumor odontogénico, maligno; odontosarcoma ameloblástico; ameloblastoma maligno; fibrosarcoma ameloblástico; pinealoma, maligno; cordoma; glioma maligno; ependimoma; astrocitoma; astrocitoma protoplásmico; 15 astrocitoma fibrilar; astroblastoma; glioblastoma; oligodendroglioma; oligodendroblastoma; neuroectodérmico primitivo; sarcoma cerebeloso; ganglioneuroblastoma; neuroblastoma; retinoblastoma; tumor neurógeno olfatorio; meningioma maligno; neurofibrosarcoma; neurilemoma maligno; tumor de células granulares, maligno; linfoma maligno; enfermedad de Hodgkin; Hodgkin; 20 paragranuloma; linfoma maligno, linfocítico pequeño; linfoma maligno, de células grandes, difuso; linfoma maligno folicular; micosis fungoide; otros linfomas no Hodgkin especificados; Linfoma de células B; linfoma no Hodgkin folicular/de bajo grado (NHL); NHL de linfocitos pequeños (SL); NHL folicular/de grado intermedio; NHL difuso de grado intermedio; NHL inmunoblástico de alto grado; NHL 25 linfoblástico de alto grado; NHL de células pequeñas no escindidas de alto grado; NHL enfermedad voluminosa; linfoma de células del manto; Linfoma relacionado con el SIDA; Macroglobulinemia de Waldenstrom; histiocitosis maligna; mieloma múltiple; sarcoma de mastocitos; enfermedad inmunoproliferativa del intestino

delgado; leucemia; leucemia linfoide; leucemia de células plasmáticas; eritroleucemia; leucemia de células de linfoma; leucemia mieloide; leucemia basófila; leucemia eosinofílica; leucemia monocítica; leucemia de mastocitos; leucemia megacarioblástica; sarcoma mieloide; leucemia de células pilosas; leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia linfoblástica aguda (ALL); leucemia mieloide aguda (AML); y leucemia mieloblástica crónica.

[000186] Las implementaciones particulares se refieren a métodos de tratamiento de leucemia. La leucemia es un cáncer de la sangre o de la médula ósea y se caracteriza por una proliferación anormal (producción por multiplicación) de glóbulos, generalmente glóbulos blancos (leucocitos). Es parte del amplio grupo de enfermedades llamadas neoplasias hematológicas. La leucemia es un término amplio que cubre un espectro de enfermedades. La leucemia se divide clínica y patológicamente en sus formas aguda y crónica.

15

[000187] En determinadas implementaciones de la presente divulgación, las células inmunitarias se administran a un individuo que lo necesita, tal como un individuo que tiene cáncer o una infección. Luego, las células mejoran el sistema inmunológico del individuo para atacar las respectivas células cancerosas o patógenas. En algunos casos, el individuo recibe una o más dosis de las células inmunes. En los casos en que al individuo se le proporcionen dos o más dosis de las células inmunes, la duración entre las administraciones debe ser suficiente para permitir el tiempo de propagación en el individuo, y en implementaciones específicas la duración entre las dosis es de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más días.

25

[000188] Ciertas implementaciones de la presente divulgación proporcionan métodos para tratar o prevenir un trastorno inmunomediado. En una

implementación, el sujeto tiene una enfermedad autoinmune. Ejemplos no limitantes de enfermedades autoinmunes incluyen: alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad autoinmune de Addison, enfermedades autoinmunes de la glándula suprarrenal, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, ooforitis y orquitis autoinmune, trombocitopenia autoinmune, enfermedad de Behcet, penfigoide ampolloso, cardiomiopatía, dermatitis celíaca-, síndrome de disfunción inmunológica por fatiga crónica (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome CREST, enfermedad de las crioaglutininas, enfermedad de Crohn, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), neuropatía IgA, artritis juvenil, liquen plano, lupus eritematoso, enfermedad de Meniere, enfermedad mixta del tejido conectivo, esclerosis múltiple, diabetes mellitus tipo 1 o inmunomediada, miastenia gravis, síndrome nefrótico (como enfermedad de cambios mínimos, glomeruloesclerosis focal o nefropatía membranosa), pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agamaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjogren, síndrome del hombre rígido, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso, colitis ulcerativa, uveítis, vasculitis (tales como poliarteritis nodosa, arteritis takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, o vasculitis de dermatitis herpetiforme), vitíligo y granulomatosis de Wegener. Por tanto, algunos ejemplos de una enfermedad autoinmune que puede tratarse usando los métodos descritos en este documento incluyen, pero no se limitan a, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, diabetes mellitus tipo I, enfermedad de Crohn; colitis ulcerativa, miastenia gravis,

glomerulonefritis, espondilitis anquilosante, vasculitis o psoriasis. El sujeto también puede tener un trastorno alérgico como el asma.

[000189] En otra implementación más, el sujeto es el receptor de un órgano trasplantado o células madre y se utilizan células inmunes para prevenir y/o tratar el rechazo. En implementaciones particulares, el sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar una enfermedad de injerto contra hospedero. La GVHD es una posible complicación de cualquier trasplante que utilice o contenga células madre de un donante relacionado o no relacionado. Hay dos tipos de GVHD, aguda y crónica. La GVHD aguda aparece dentro de los primeros tres meses después del trasplante. Los signos de la GVHD aguda incluyen una erupción cutánea rojiza en las manos y los pies que puede extenderse y volverse más grave, con descamación o ampollas en la piel. La GVHD aguda también puede afectar el estómago y los intestinos, en cuyo caso se presentan calambres, náuseas y diarrea. El color amarillento de la piel y los ojos (ictericia) indica que la GVHD aguda ha afectado el hígado. La GVHD crónica se clasifica según su gravedad: el estadio/grado 1 es leve; el estadio/grado 4 es severo. La GVHD crónica se desarrolla tres meses o más después del trasplante. Los síntomas de la GVHD crónica son similares a los de la GVHD aguda, pero, además, la GVHD crónica también puede afectar las glándulas mucosas de los ojos, las glándulas salivales de la boca y las glándulas que lubrican el revestimiento del estómago y los intestinos. Puede utilizarse cualquiera de las poblaciones de células inmunitarias descritas en el presente documento. Los ejemplos de un órgano trasplantado incluyen un trasplante de órgano sólido, como riñón, hígado, piel, páncreas, pulmón y/o corazón, o un trasplante celular como islotes, hepatocitos, mioblastos, médula ósea o células madre hematopoyéticas u otras. El trasplante puede ser un trasplante compuesto, como tejidos de la cara. Las células inmunes se pueden administrar antes del trasplante, al mismo tiempo que el trasplante o después del trasplante. En algunas implementaciones, las células inmunes se

administran antes del trasplante, como al menos 1 hora, al menos 12 horas, al menos 1 día, al menos 2 días, al menos 3 días, al menos 4 días, al menos 5 días, al menos 6 días, al menos 1 semana, al menos 2 semanas, al menos 3 semanas, al menos 4 semanas o al menos 1 mes antes del trasplante. En un ejemplo
5 específico, no limitante, la administración de la cantidad terapéuticamente eficaz de células inmunes se produce 3-5 días antes del trasplante.

[000190] En algunas implementaciones, al sujeto se le puede administrar quimioterapia de linfodepleción no mieloablativa antes de la terapia de
10 células inmunes. La quimioterapia de linfodepleción no mieloablativa puede ser cualquier terapia de este tipo adecuada, que puede administrarse por cualquier vía adecuada. La quimioterapia de linfodepleción no mieloablativa puede comprender, por ejemplo, la administración de ciclofosfamida y fludarabina, particularmente si el cáncer es melanoma, que puede ser metastásico. Una vía ejemplar de
15 administración de la ciclofosfamida y la fludarabina es por vía intravenosa. Asimismo, se puede administrar cualquier dosis adecuada de ciclofosfamida y fludarabina. En aspectos particulares, se administran alrededor de 60 mg/kg de ciclofosfamida durante dos días, tras lo cual se administran alrededor de 25 mg/m² de fludarabina durante cinco días.

[000191] En determinadas implementaciones, se administra al sujeto un factor de crecimiento que promueve el crecimiento y la activación de las células inmunitarias, ya sea de forma concomitante con las células inmunitarias o posteriormente a las células inmunitarias. El factor de crecimiento de las células
25 inmunitarias puede ser cualquier factor de crecimiento adecuado que promueva el crecimiento y la activación de las células inmunitarias. Ejemplos de factores de crecimiento de células inmunes adecuados incluyen interleuquinas (IL)-2, IL-7, IL-15 e IL-12, que se pueden usar solos o en varias combinaciones, tales como IL-2

e IL-7, IL-2 e IL-15, IL-7 e IL-15, IL-2, IL-7 e IL-15, IL-12 e IL-7, IL-12 e IL-15, o IL-12 e IL2.

[000192] Se pueden administrar cantidades terapéuticamente eficaces de células inmunitarias mediante varias vías, incluida la administración parenteral, por ejemplo, inyección o infusión intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraesternal o intraarticular.

[000193] La cantidad terapéuticamente eficaz de células inmunes para uso en la terapia celular adoptiva es la cantidad que consigue un efecto deseado en un sujeto que está siendo tratado. Por ejemplo, esta puede ser la cantidad de células inmunes necesarias para inhibir el avance, o para causar la regresión de una enfermedad autoinmune o aloinmune, o que es capaz de aliviar los síntomas causados por una enfermedad autoinmune, como dolor e inflamación. Puede ser la cantidad necesaria para aliviar los síntomas asociados a la inflamación, como dolor, edema y temperatura elevada. También puede ser la cantidad necesaria para disminuir o prevenir el rechazo de un órgano trasplantado.

[000194] La población de células inmunes se puede administrar en regímenes de tratamiento compatibles con la enfermedad, por ejemplo, una o pocas dosis durante uno a varios días para mejorar un estado de enfermedad o dosis periódicas durante un tiempo prolongado para inhibir la progresión de la enfermedad y prevenir la reaparición. La dosis precisa que se empleará en la formulación también dependerá de la vía de administración y de la gravedad de la enfermedad o trastorno, y debería decidirse según el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente. La cantidad terapéuticamente eficaz de células inmunitarias dependerá del sujeto que se esté tratando, la gravedad y el tipo de aflicción y la forma de administración. En algunas implementaciones, las dosis que podrían usarse en el tratamiento de sujetos humanos oscilan entre al menos $3.8 \times$

10⁴, al menos 3.8 × 10⁵, al menos 3.8 × 10⁶, al menos 3.8 × 10⁷, al menos 3.8 × 10⁸, al menos 3.8 × 10⁹, o al menos 3.8 × 10¹⁰ células inmunes/m². En una determinada implementación, la dosis usada en el tratamiento de sujetos humanos varía de aproximadamente 3.8 × 10⁹ a aproximadamente 3.8 × 10¹⁰ células inmunes/m². En implementaciones adicionales, una cantidad terapéuticamente eficaz de células inmunes puede variar desde aproximadamente 5 × 10⁶ células por kg de peso corporal hasta aproximadamente 7.5 × 10⁸ células por kg de peso corporal, tal como aproximadamente 2 × 10⁷ células hasta aproximadamente 5 × 10⁸ células por kg de peso corporal, o alrededor de 5 × 10⁷ células a alrededor de 2 × 10⁸ células por kg de peso corporal. La cantidad exacta de células inmunes la determina fácilmente un versado en el arte basándose en la edad, el peso, el sexo y el estado fisiológico del sujeto. Las dosis efectivas se pueden extrapolar a partir de las curvas de respuesta a la dosis derivada de sistemas de ensayo de modelos animales o *in vitro*.

[000195] Las células inmunes se pueden administrar en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos para el tratamiento del trastorno inmunomediado. Las terapias combinadas pueden incluir, pero no se limitan a, uno o más agentes antimicrobianos (por ejemplo, antibióticos, agentes antivirales y agentes antifúngicos), agentes antitumorales (por ejemplo, fluorouracilo, metotrexato, paclitaxel, fludarabina, etopósido, doxorubicina o vincristina), agentes de inmunodepleción (por ejemplo, fludarabina, etopósido, doxorubicina o vincristina), agentes inmunosupresores (por ejemplo, azatioprina o glucocorticoides, como dexametasona o prednisona), agentes antiinflamatorios (por ejemplo, glucocorticoides tales como hidrocortisona, dexametasona o prednisona, o agentes antiinflamatorios no esteroideos tales como ácido acetilsalicílico, ibuprofeno o naproxeno sódico), citoquinas (por ejemplo, interleuquina-10 o factor de crecimiento transformante beta), hormonas (por

ejemplo, estrógeno) o una vacuna. Además, agentes inmunosupresores o tolerogénicos que incluyen pero no se limitan a inhibidores de calcineurina (e.g., ciclosporina y tacrolimus); inhibidores de mTOR (e.g., rapamicina); micofenolato de mofetilo, anticuerpos (e.g., que reconocen células CD3, CD4, CD40, CD154, CD45, IVIG o B); agentes quimioterapéuticos (e.g., metotrexato, treosulfano, busulfano); irradiación; o se pueden administrar quimioquinas, interleuquinas o sus inhibidores (e.g., BAFF, IL-2, anti-IL-2R, IL-4, inhibidores de quinasa JAK). Dichos agentes farmacéuticos adicionales se pueden administrar antes, durante o después de la administración de las células inmunitarias, dependiendo del efecto deseado. Esta administración de las células y el agente puede ser por la misma vía o por vías diferentes, y en el mismo sitio o en un sitio diferente.

B. Composiciones farmacéuticas

[000196] También se proporcionan en este documento composiciones y formulaciones farmacéuticas que comprenden células inmunitarias (e.g., células T o células NK) y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[000197] Las composiciones y formulaciones farmacéuticas como se describen en el presente documento se pueden preparar mezclando los ingredientes activos (como un anticuerpo o un polipéptido) que tengan el grado de pureza deseado con uno o más vehículos opcionales farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 22a edición, 2012), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son generalmente no tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen, pero no se limitan a: búfer tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de

octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10
5 residuos); proteínas, como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes como EDTA; azúcares como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones
10 formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (e.g., complejos de Zn-proteína); y/o tensoactivos no iónicos tales como polietilenglicol (PEG). Los vehículos farmacéuticamente aceptables ejemplares en la presente incluyen además agentes de dispersión de fármacos intersticiales tales como glicoproteínas hialuronidasas activas neutras solubles (sHASEGP), por ejemplo,
15 glicoproteínas hialuronidasas PH-20 solubles humanas, tales como rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Ciertos ejemplos de sHASEGP y métodos de uso, que incluyen rHuPH20, se describen en las publicaciones de patente de Estados Unidos números 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, una sHASEGP se combina con una o más glicosaminoglicanasas adicionales tales
20 como condroitinasas.

C. Terapias de combinación

[000198] En determinadas implementaciones, las composiciones y
25 métodos de las presentes implementaciones implican una población de células inmunitarias en combinación con al menos una terapia adicional. La terapia adicional puede ser radioterapia, cirugía (e.g., Lumpectomía y Mastectomía), quimioterapia, terapia génica, terapia con DNA, terapia viral, terapia con RNA,

inmunoterapia, trasplante de médula ósea, nanoterapia, terapia con anticuerpos monoclonales o una combinación de las anteriores. La terapia adicional puede ser en forma de terapia adyuvante o neoadyuvante.

5 **[000199]** En algunas implementaciones, la terapia adicional es la administración de un inhibidor enzimático de molécula pequeña o un agente antimetastásico. En algunas implementaciones, la terapia adicional es la administración de agentes limitantes de efectos secundarios (e.g., agentes destinados a disminuir la aparición y/o gravedad de los efectos secundarios del
10 tratamiento, tales como agentes contra las náuseas, etc.). En algunas implementaciones, la terapia adicional es radioterapia. En algunas implementaciones, la terapia adicional es cirugía. En algunas implementaciones, la terapia adicional es una combinación de radioterapia y cirugía. En algunas implementaciones, la terapia adicional es la irradiación gamma. En algunas
15 implementaciones, la terapia adicional es una terapia dirigida a la vía PBK/AKT/mTOR, inhibidor de HSP90, inhibidor de tubulina, inhibidor de apoptosis y/o agente quimiopreventivo. La terapia adicional puede tener uno o más de los agentes quimioterapéuticos conocidos en el arte.

20 **[000200]** Se puede administrar una terapia de células inmunes antes, durante, después o en diversas combinaciones en relación con una terapia de cáncer adicional, tal como la terapia de puntos de control inmunológico. Las administraciones pueden realizarse en intervalos que van desde simultáneamente hasta minutos hasta días o semanas. En las implementaciones en las que la
25 terapia con células inmunitarias se proporciona a un paciente por separado de un agente terapéutico adicional, generalmente se aseguraría que no expira un período de tiempo significativo entre el momento de cada entrega, de modo que los dos compuestos aún puedan ejercer un efecto combinado ventajoso sobre el

paciente. En tales casos, se contempla que se pueda proporcionar a un paciente la terapia con anticuerpos y la terapia anticancerosa dentro de aproximadamente 12 a 24 o 72 h entre sí y, más particularmente, dentro de aproximadamente 6-12 h entre sí. En algunas situaciones, puede ser deseable extender el período de tiempo para el tratamiento significativamente desde varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7) hasta varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, o 8) lapso entre administraciones respectivas.

[000201] Se pueden emplear varias combinaciones. Para el siguiente ejemplo, una terapia de células inmunes es "A" y una terapia contra el cáncer es "B":

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B
B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A
B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

[000202] La administración de cualquier compuesto o terapia de las presentes implementaciones a un paciente seguirá los protocolos generales para la administración de tales compuestos, teniendo en cuenta la toxicidad, si la hay, de los agentes. Por lo tanto, en algunas implementaciones hay una etapa de monitorización de la toxicidad que es atribuible a la terapia de combinación.

1. Quimioterapia

[000203] Se puede usar una amplia variedad de agentes quimioterapéuticos de acuerdo con las presentes implementaciones. El término "quimioterapia" se refiere al uso de medicamentos para tratar el cáncer. Un "agente quimioterapéutico" se usa para connotar un compuesto o composición que se administra en el tratamiento del cáncer. Estos agentes o fármacos se clasifican

según su modo de actividad dentro de una célula, por ejemplo, si afectan el ciclo celular y en qué etapa. Alternativamente, un agente puede caracterizarse basándose en su capacidad para reticular directamente el DNA, intercalarse en el DNA o inducir aberraciones cromosómicas y mitóticas afectando la síntesis de
5 ácidos nucleicos.

[000204] Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes, tales como tiotepa y ciclosfosfamida; alquil sulfonatos, tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas, tales como benzodopa, carbocadona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas, que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentionfosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); una camptotecina (incluido el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluidos sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas
10 (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluidos los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictyina; espongistatina; mostazas de nitrógeno, tales como clorambucil, clornafazina, cloofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida y mostaza uracilo; nitrosureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos, tales como los antibióticos enediyne (e.g., caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gammall y caliqueamicina omegal1); dinemicina, incluida dinemicina A; bisfosfonatos, tal como clodronato; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y
25 cromóforos antibióticos relacionado con enediyne cromoproteína, aclacinomisinas, actinomicina, autraricina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo

morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxydoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarubicina, marcellomicina, mitomicinas, tal como motomicina C, ácido micofenólico, nogalarnicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorumicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina y zorrubicina; anti-metabolitos, tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico, tal como denopterina, pteropterina y trimetrexato; análogos de purina, tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina y tioguanina; análogos de pirimidina, tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina y floxuridina; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiostanol, mepitioetano y testolactona; anti-adrenales, tales como mitotano y trilostano; reforzador de ácido fólico, tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elformitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglucido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinan; lonidainina; maitansinoides, tal como maitansina y ansamitoquinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; phenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; Complejo de polisacárido PSK; razoxano; rizoxina; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; taxoides, e.g., paclitaxel y docetaxel gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; complejos de coordinación de platino, tales como cisplatino, oxaliplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; irinotecan (e.g., CPT-

11); inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO);
retinoides, tal como ácido retinoico; capecitabina; carboplatino, procarbazona,
policomicina, gemcitabina, navelbina, inhibidores de farnesil-proteína transferasa,
transplatino y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de
5 cualquiera de los anteriores.

2. Radioterapia

[000205] Otros factores que causan daño al DNA y que se han utilizado
10 ampliamente incluyen lo que se conoce comúnmente como rayos γ, rayos X y/o la
administración dirigida de radioisótopos a las células tumorales. También se
contemplan otras formas de factores que dañan el DNA, tales como microondas,
irradiación con haz de protones (Patentes de Estados Unidos 5,760,395 y
4,870,287) e irradiación UV. Lo más probable es que todos estos factores afecten
15 a una amplia gama de daños en el DNA, en los precursores del DNA, en la
replicación y reparación del DNA y en el ensamblaje y mantenimiento de los
cromosomas. Los rangos de dosificación para rayos X varían desde dosis diarias
de 50 a 200 roentgens durante períodos prolongados de tiempo (3 a 4 semanas),
hasta dosis únicas de 2000 a 6000 roentgens. Los rangos de dosificación de
20 radioisótopos varían ampliamente y dependen de la vida media del isótopo, la
fuerza y el tipo de radiación emitida y la captación por las células neoplásicas.

3. Inmunoterapia

25 [000206] Los versados en el arte comprenderá que pueden usarse
inmunoterapias adicionales en combinación o junto con los métodos de las
implementaciones. En el contexto del tratamiento del cáncer, la inmunoterapia, en
general, se basa en el uso de células y moléculas efectoras inmunes para atacar y

destruir las células cancerosas. Rituximab (RITUXAN®) es un ejemplo. El efector inmune puede ser, por ejemplo, un anticuerpo específico para algún marcador en la superficie de una célula tumoral. El anticuerpo solo puede servir como un efector de la terapia o puede reclutar otras células para afectar realmente la muerte celular. El anticuerpo también puede conjugarse con un fármaco o toxina (quimioterapéutico, radionúclido, cadena A de ricina, toxina del cólera, toxina de la tos ferina, etc.) y servir como agente de dirección. Alternativamente, el efector puede ser un linfocito que lleva una molécula de superficie que interactúa, directa o indirectamente, con una célula tumoral diana. Varias células efectoras incluyen células T citotóxicas y células NK.

[000207] Los conjugados anticuerpos-fármaco han surgido como un enfoque revolucionario para el desarrollo de terapias contra el cáncer. El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo. Los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) comprenden anticuerpos monoclonales (MAb) que están unidos covalentemente a fármacos que destruyen células. Este enfoque combina la alta especificidad de los MAb contra sus dianas antigénicas con fármacos citotóxicos muy potentes, lo que da como resultado MAb "armados" que entregan la carga útil (fármaco) a las células tumorales con niveles enriquecidos del antígeno. La administración dirigida del fármaco también minimiza su exposición en los tejidos normales, lo que resulta en una menor toxicidad y un índice terapéutico mejorado. La aprobación de dos medicamentos ADC, ADCETRIS® (brentuximab vedotin) en 2011 y KADCYLA® (trastuzumab emtansina o T-DM1) validado el enfoque en 2013 por la FDA. Actualmente, hay más de 30 fármacos candidatos a ADC en diversas etapas de ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer (Leal *et al.*, 2014). A medida que la ingeniería de anticuerpos y la optimización de la carga útil del enlazador se vuelven cada vez más maduros, el descubrimiento y el desarrollo de nuevos ADC dependen cada vez más de la identificación y validación de

nuevos objetivos que sean adecuados para este enfoque y la generación de MAbs de orientación. Dos criterios para las dianas ADC son los niveles regulados/altos de la expresión en células tumorales y la internalización robusta.

5 **[000208]** En un aspecto de la inmunoterapia, la célula tumoral debe portar algún marcador que sea susceptible de ser dirigido, i.e., que no esté presente en la mayoría de las otras células. Existen muchos marcadores tumorales y cualquiera de estos puede ser adecuado para dirigirse en el contexto de las presentes implementaciones. Los marcadores tumorales comunes incluyen

10 CD20, antígeno carcinoembrionario, tirosinasa (p97), gp68, TAG-72, HMFG, antígeno de Sialyl Lewis, MucA, MucB, PLAP, receptor de laminina, erb B y p155. Un aspecto alternativo de la inmunoterapia es combinar efectos anticancerígenos con efectos inmunoestimuladores. También existen moléculas inmunoestimulantes que incluyen: citoquinas, como IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSF, gamma-IFN,

15 quimioquinas, como MIP-1, MCP-1, IL-8 y factores de crecimiento, como el ligando FLT3.

[000209] Ejemplos de inmunoterapias actualmente en investigación o en uso son adyuvantes inmunes, e.g., *Mycobacterium bovis*, *Plasmodium*

20 *falciparum*, dinitroclorobenceno y compuestos aromáticos (Patentes de Estados Unidos 5,801,005 y 5,739,169; Hui y Hashimoto, 1998; Christodoulides *et al.*, 1998); terapia con citoquinas, e.g., interferones α , β , y γ , IL-1, GM-CSF y TNF (Bukowski *et al.*, 1998; Davidson *et al.*, 1998; Hellstrand *et al.*, 1998); terapia génica, e.g., TNF, IL-1, IL-2 y p53 (Qin *et al.*, 1998; Austin-Ward y Villaseca, 1998;

25 Patentes de Estados Unidos 5,830,880 y 5,846,945); y anticuerpos monoclonales, e.g., anti-CD20, anti-gangliósido GM2 y anti-p185 (Hollander, 2012; Hanibuchi *et al.*, 1998; Patente de Estados Unidos 5,824,311). Se contempla que se puedan

emplear una o más terapias contra el cáncer con las terapias con anticuerpos descritas en este documento.

[000210] En algunas implementaciones, la inmunoterapia puede ser un inhibidor del punto de control inmunológico. Los puntos de control inmunológico activan una señal (e.g., moléculas coestimuladoras) o rechazan una señal. Los puntos de control inmunitarios inhibidores que pueden ser el objetivo del bloqueo del punto de control inmunológico incluyen el receptor de adenosina A2A (A2AR), B7-H3 (también conocido como CD276), atenuador de linfocitos B y T (BTLA), proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxica (CTLA-4), también conocida como CD152), indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO), inmunoglobulina de células asesinas (KIR), gen de activación de linfocitos-3 (LAG3), muerte programada 1 (PD-1), dominio de inmunoglobulina de células T y dominio de mucina 3 (TIM-3) y supresor de Ig de dominio V de activación de células T (VISTA). En particular, los inhibidores del punto de control inmunológico se dirigen al eje PD-1 y/o CTLA-4.

[000211] Los inhibidores del punto de control inmunológico pueden ser fármacos tales como moléculas pequeñas, formas recombinantes de ligandos o receptores o, en particular, son anticuerpos, tales como anticuerpos humanos (e.g., Publicación de patente internacional WO2015016718; *Pardoll, Nat Rev Cancer*, 12 (4): 252-64, 2012; ambas incorporadas aquí como referencia). Se pueden usar inhibidores conocidos de las proteínas del punto de control inmunológico o análogos de las mismas, en particular se pueden usar formas de anticuerpos quimerizados, humanizados o humanos. Como sabrá el versado en el arte, se pueden utilizar nombres alternativos y/o equivalentes para ciertos anticuerpos mencionados en la presente divulgación. Dichos nombres alternativos y/o equivalentes son intercambiables en el contexto de la presente divulgación. Por ejemplo, se sabe que el lambrolizumab también se conoce con los nombres alternativos y equivalentes de MK-3475 y pembrolizumab.

[000212] En algunas implementaciones, el antagonista de unión de PD-1 es una molécula que inhibe la unión de PD-1 a sus compañeros de unión de ligando. En un aspecto específico, los compañeros de unión del ligando PD-1 son PDL1 y/o PDL2. En otra implementación, un antagonista de unión de PDL1 es una molécula que inhibe la unión de PDL1 a sus compañeros de unión. En un aspecto específico, los compañeros de unión de PDL1 son PD-1 y/o B7-1. En otra implementación, el antagonista de unión de PDL2 es una molécula que inhibe la unión de PDL2 a sus compañeros de unión. En un aspecto específico, un compañero de unión de PDL2 es PD-1. El antagonista puede ser un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno del mismo, una inmunoadhesina, una proteína de fusión u oligopéptido. Los anticuerpos ejemplares se describen en las patentes estadounidenses números US8735553, US8354509 y US8008449, todas incorporadas aquí como referencia. Se conocen en el arte otros antagonistas del eje PD-1 para usar en los métodos proporcionados en el presente documento, tal como se describe en la solicitud de patente estadounidense N° US20140294898, US2014022021 y US20110008369, todos incorporados en el presente documento como referencia.

[000213] En algunas implementaciones, el antagonista de unión a PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 (e.g., un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico). En algunas implementaciones, el anticuerpo anti-PD-1 se selecciona del grupo que consiste en nivolumab, pembrolizumab y CT-011. En algunas implementaciones, el antagonista de unión a PD-1 es una inmunoadhesina (e.g., una inmunoadhesina que comprende una parte extracelular o de unión a PD-1 de PDL1 o PDL2 fusionada a una región constante (e.g., una región Fc de una secuencia de inmunoglobulina). En algunas implementaciones, el antagonista de unión a PD-1 es AMP-224. Nivolumab,

también conocido como MDX-1106-04, MDX-1106, ONO-4538, BMS-936558 y OPDIVO®, es un anticuerpo anti-PD-1 descrito en WO2006/121168. Pembrolizumab, también conocido como MK-3475, Merck 3475, lambrolizumab, KEYTRUDA® y SCH-900475, es un anticuerpo anti-PD-1 descrito en
5 WO2009/114335. CT-011, también conocido como hBAT o hBAT-1, es un anticuerpo anti-PD-1 descrito en WO2009/101611. AMP-224, también conocido como B7-DCIg, es un receptor soluble de fusión PDL2-Fc descrito en WO2010/027827 y WO2011/066342.

10 **[000214]** Otro punto de control inmunológico que puede ser dirigido en los métodos proporcionados en este documento es la proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), también conocida como CD152. La secuencia de cDNA completa de CTLA-4 humana tiene el número de acceso de Genbank L15006. CTLA-4 se encuentra en la superficie de las células T y actúa como un
15 interruptor de "apagado" cuando se une a CD80 o CD86 en la superficie de las células presentadoras de antígeno. CTLA4 es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas que se expresa en la superficie de las células T colaboradoras y transmite una señal inhibidora a las células T. CTLA4 es similar a la proteína coestimuladora de células T, CD28, y ambas moléculas se unen a CD80 y CD86,
20 también llamadas B7-1 y B7-2 respectivamente, en células presentadoras de antígenos. CTLA4 transmite una señal inhibidora a las células T, mientras que CD28 transmite una señal estimuladora. El CTLA4 intracelular también se encuentra en las células T reguladoras y puede ser importante para su función. La activación de las células T a través del receptor de células T y CD28 conduce a
25 una mayor expresión de CTLA-4, un receptor inhibidor de las moléculas B7.

[000215] En algunas implementaciones, el inhibidor del punto de control inmunológico es un anticuerpo anti-CTLA-4 (e.g., un anticuerpo humano, un

anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico), un fragmento de unión a antígeno del mismo, una inmunoadhesina, una proteína de fusión u oligopéptido.

[000216] Se pueden generar anticuerpos anti-CTLA-4 humano (o dominios VH y/o VL derivados de los mismos) adecuados para uso en los presentes métodos utilizando métodos bien conocidos en el arte. Alternativamente, pueden usarse anticuerpos anti-CTLA-4 reconocidos en el arte. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CTLA-4 descritos en: US 8,119,129, WO 01/14424, WO 98/42752; WO 00/37504 (CP675,206, también conocido como tremelimumab; anteriormente ticilimumab), Patente de Estados Unidos N°. 6,207,156; Hurwitz *et al.* (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (17): 10067-10071; Camacho *et al.* (2004) *J Clin Oncology* 22 (145): Resumen N°. 2505 (anticuerpo CP-675206); y Mokyr *et al.* (1998) *Cancer Res* 58: 5301-5304 se pueden usar en los métodos descritos en este documento. Las enseñanzas de cada una de las publicaciones mencionadas anteriormente se incorporan aquí como referencia. También pueden usarse anticuerpos que compiten con cualquiera de estos anticuerpos reconocidos en el arte por unirse a CTLA-4. Por ejemplo, un anticuerpo CTLA-4 humanizado se describe en las Solicitudes de Patente Internacional No. WO2001014424, WO2000037504 y Patente de Estados Unidos No. 8,017,114; todos incorporados aquí como referencia.

[000217] Un anticuerpo anti-CTLA-4 ejemplar es ipilimumab (también conocido como 10D1, MDX-010, MDX-101 y Yervoy®) o fragmentos de unión a antígeno y variantes del mismo (Ver, e.g., WO 01/14424). En otras implementaciones, el anticuerpo comprende las CDR o VR de cadena pesada y ligera de ipilimumab. Por consiguiente, en una implementación, el anticuerpo comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la región VH de ipilimumab, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la región VL de ipilimumab. En otra

implementación, el anticuerpo compite por unirse y/o se une al mismo epítopo en CTLA-4 que los anticuerpos mencionados anteriormente. En otra implementación, el anticuerpo tiene al menos aproximadamente 90% de identidad de secuencia de aminoácidos de región variable con los anticuerpos mencionados anteriormente (e.g., al menos aproximadamente 90%, 95% o 99% de identidad de región variable con ipilimumab).

[000218] Otras moléculas para modular CTLA-4 incluyen ligandos y receptores CTLA-4 tales como los descritos en las Patentes de Estados Unidos Nos. US5844905, US5885796 y las Solicitudes de Patentes Internacionales Nos. WO1995001994 y WO1998042752; todas incorporadas aquí como referencia, e inmunoadhesinas tales como las descritas en la Patente de EE.UU. No. US8329867, incorporada aquí como referencia.

4. Cirugía

[000219] Aproximadamente el 60% de las personas con cáncer se someterán a cirugía de algún tipo, que incluye cirugía preventiva, diagnóstica o de estadificación, curativa y paliativa. La cirugía curativa incluye la resección en la que todo o parte del tejido canceroso se extrae, extirpa y/o destruye físicamente y se puede usar junto con otras terapias, como el tratamiento de las presentes implementaciones, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, terapia génica, inmunoterapia y/o terapias alternativas. La resección del tumor se refiere a la extirpación física de al menos parte de un tumor. Además de la resección del tumor, el tratamiento mediante cirugía incluye cirugía con láser, criocirugía, electrocirugía y cirugía controlada microscópicamente (cirugía de Mohs).

[000220] Tras la escisión de parte o la totalidad de las células cancerosas, tejido o tumor, se puede formar una cavidad en el cuerpo. El tratamiento se puede realizar mediante perfusión, inyección directa o aplicación local del área con una terapia adicional contra el cáncer. Dicho tratamiento puede repetirse, por ejemplo, cada 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, o cada 1, 2, 3, 4 y 5 semanas o cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. Estos tratamientos también pueden ser de diferentes dosis.

5. Otros agentes

[000221] Se contempla que se pueden usar otros agentes en combinación con ciertos aspectos de las presentes implementaciones para mejorar la eficacia terapéutica del tratamiento. Estos agentes adicionales incluyen agentes que afectan la regulación positiva de los receptores de la superficie celular y las uniones GAP, agentes citostáticos y de diferenciación, inhibidores de la adhesión celular, agentes que aumentan la sensibilidad de las células hiperproliferativas a los inductores apoptóticos u otros agentes biológicos. Los aumentos en la señalización intercelular al elevar el número de uniones GAP aumentarían los efectos antihiperproliferativos en la población de células hiperproliferativas vecinas. En otras implementaciones, se pueden usar agentes citostáticos o de diferenciación en combinación con ciertos aspectos de las presentes implementaciones para mejorar la eficacia antihiperproliferativa de los tratamientos. Se contempla que los inhibidores de la adhesión celular mejoren la eficacia de las presentes implementaciones. Ejemplos de inhibidores de la adhesión celular son los inhibidores de la quinasa de adhesión focal (FAK) y la lovastatina. Se contempla además que otros agentes que aumentan la sensibilidad de una célula hiperproliferativa a la apoptosis, tales como el anticuerpo c225,

podrían usarse en combinación con ciertos aspectos de las presentes implementaciones para mejorar la eficacia del tratamiento.

IV. Artículos de fabricación o kits

5 **[000222]** También se proporciona aquí un artículo de fabricación o un kit que comprende células inmunitarias. El artículo de fabricación o kit puede comprender además un prospecto que comprende instrucciones para usar las células inmunes para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo o para mejorar la función inmunológica de un individuo que tiene cáncer. Cualquiera

10 de las células inmunes específicas de antígeno descritas en el presente documento puede incluirse en el artículo de fabricación o kits. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, bolsas y jeringas. El recipiente puede estar formado por una variedad de materiales como vidrio, plástico (como cloruro de polivinilo o poliolefina) o aleación de metal (como acero inoxidable o

15 hastelloy). En algunas implementaciones, el recipiente contiene la formulación y la etiqueta en, o asociada con, el recipiente puede indicar instrucciones de uso. El artículo de fabricación o kit puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluidos otros búfers, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones de uso. En algunas

20 implementaciones, el artículo de fabricación incluye además uno o más de otro agente (e.g., un agente quimioterapéutico y un agente antineoplásico). Los recipientes adecuados para uno o más agentes incluyen, por ejemplo, botellas, viales, bolsas y jeringas.

25 V. Ejemplos

[000223] Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar implementaciones preferidas de la invención. Los versados en el arte deben

apreciar que las técnicas descritas en los ejemplos que siguen representan técnicas que el inventor ha descubierto que funcionan bien en la práctica de la invención y, por tanto, se puede considerar que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los versados en el arte deberán, a la luz de la presente
5 divulgación, apreciar que se pueden realizar muchos cambios en las implementaciones específicas que se describen y aún obtener un resultado similar o similar sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.

Ejemplo 1: Células CAR NK con eliminación de CISH

10

[000224] Se aislaron células NK mediante selección negativa de 3 unidades diferentes de sangre de cordón (CB) y se expandieron. A continuación, las células NK se transdujeron con el constructo CAR y se realizó CISH KO para cada CB en diferentes momentos. Se obtuvieron cuatro grupos diferentes de
15 células para cada unidad CB, incluyendo NT, NT CISH KO, CAR19/IL-15 y CAR19/IL-15 CISH KO.

[000225] Específicamente, el día 1, los NK se aislaron mediante selección negativa, se cocultivaron con APC irradiadas (K562 que expresa 41BB e
20 IL-21 en su superficie) en una proporción de 1:2 (NK: APC) en SCGM con IL-2200. unidades/ml. El medio se cambió cada 2 días con SCGM reciente e IL-2 200 unidades/ml.

[000226] El día 5, se volvieron a seleccionar las células NK para
25 obtener células NK puras y se realizó la transducción de CAR. En este momento, estaban presentes tanto células no transducidas (NT) como células CAR NK. La eficiencia de la transducción de CAR se midió 3 días después de la transducción.

[000227] El día 7, se añadieron APC irradiadas para volver a expandir las células NK (tanto NT como CAR NK). Las células NK se cultivaron en SCGM con IL-2 200 U/ml. El medio se cambió cada 2 días con SCGM reciente e IL-2 200 U/ml.

5

[000228] El día 14, se utilizó CRISPR Cas9 para CISH KO en células CAR NK utilizando electroporación de neón. Se diseñaron dos sgRNA dirigidos al exón 4 del gen CISH. Aproximadamente 15-30 minutos antes de la electroporación, la proteína Cas9 y el sgRNA se incubaron a temperatura ambiente en una reacción 1:1 con 10 ug de Cas9 y 10 ug de sgRNA (5000 ng de sgRNA #1 y 5000 ng de sgRNA #2). El producto de incubación (i.e., sgRNA y Cas9 unidos entre sí) se sometió a electroporación en 1-2 millones de células con una punta de electroporación de 100 ul. Las condiciones de electroporación fueron 1600 V, 10 ms, 3 pulsos, usando el búfer T. Las diferentes preparaciones de células (células CAR NK electroporadas, células CAR NK control y células NT NK) se cocultivaron con APC irradiadas en proporción 1:2 (NK: APC) en SCGM con IL-2 20 U/mL. El medio se cambió cada 2 días con SCGM reciente e IL-2 200 U/ml. El día 15, se realizó la PCR para comprobar la eficacia de KO.

10

15

20

[000229] Finalmente, se realizaron estudios funcionales el día 21. Las células de los 4 grupos se cultivaron conjuntamente en una placa de 96 pozos con BFA y Raji en una proporción de 2:1 durante 6 horas. A continuación, se realizó la tinción para comparar la producción de citoquinas (IFN γ , TNF α y CD107 α) que se evaluaron mediante citometría de flujo. El ensayo de liberación de cromo se realizó el día 21 para comparar la citotoxicidad de los 4 grupos diferentes de células para cada CB. El análisis estadístico se realizó utilizando Anova bidireccional con comparaciones múltiples utilizando la prueba de Bonferroni.

25

[000230] La edición de genes de células NK es más desafiante que la de células T. A diferencia de las células T, las células NK necesitan células alimentadoras para crecer bien *in vitro*, lo que hace que el proceso de edición de genes sea más complejo. Las células NK también son más frágiles e históricamente se sabe que tienen poca viabilidad después de la manipulación genética. La viabilidad actual después de la transducción de CAR y CISH KO fue superior al 95%.

Ejemplo 2 - Caracterización *in vivo* de células NK

[000231] Para caracterizar las células CAR NK con CISH KO *in vivo*, se estudiaron ratones hembra sin NSG de 10 semanas de edad. A los ratones se les inyectó 20×10^3 células Raji-FFLuc. Para las células efectoras, se les inyectó con Célula #1 - Célula #3, 3×10^6 o 10^7 células/animal dependiendo de los grupos siguientes.

[000232] Categorías de grupo: 5 ratones/grupo, 7 grupos y 35 ratones en total,

- Grupo # 1: solo Raji-FFLuc
- Grupo # 2: Raji-FFLuc + Células #1 3×10^6 células/animal
- Grupo # 3: Raji-FFLuc + Células #1 10^7 células/animal
- Grupo # 4: Raji-FFLuc + Células #2 3×10^6 células/animal
- Grupo # 5: Raji-FFLuc + Células # 2 10^7 células/animal
- Célula # 1: NKCAR19 cas9 + electroporación
- Célula # 3: NKCAR19 CISH KO

[000233] A los ratones se les administró células Raji solas o en combinación con células CAR NK. Las células CAR NK son de tipo salvaje, solo cas9, o tenían inactivación de CISH. Se encontró que los ratones que recibieron

las células CAR NK CISH inactivadas habían aumentado la supervivencia, no mostraron evidencia de linfoma Raji y no mostraron CRS. Las células NK CISH inactivadas también persistieron más tiempo *in vivo* y pudieron detectarse hasta 7 semanas después de la infusión.

5

Ejemplo 3: la delección del punto de control CIS modula la aptitud de las células asesinas naturales transducidas con CAR derivadas de la sangre del cordón umbilical

10 **[000234]** **La Funcionalidad *in vitro* mejorada en células NK iC9/CAR19/IL-15 deficientes en CIS:** Se evaluaron los niveles de expresión de CIS para determinar si las células CB-NK iC9/CAR19/IL-15 están sujetas a los mismos circuitos contrarreguladores que regulan fisiológicamente la señalización de citoquinas en células NK no modificadas. Se cultivaron células CB-NK con una
15 línea de células alimentadoras K562 diseñada para expresar IL21 unido a membrana, ligando 4-1BB y CD48 (uAPC) en presencia de IL-2 durante 21 días. Las células NK se transdujeron el día +4 con un vector retroviral que expresa iC9/CAR19/IL-15 como se describe en los materiales y métodos o no se transdujeron (NT, control). La expresión de CIS aumentó significativamente
20 durante la expansión *in vitro* del control de NT y las células CB-NK iC9/CAR19/IL-15 a lo largo del tiempo (**FIG. 7A**). Notablemente, los niveles de expresión de CIS fueron más prominentes en las células iC9/CAR19/IL-15 en comparación con las células NT CB-NK probablemente debido al efecto adicional de IL-15 sobre la inducción de CIS (**FIG. 7A**).

25

[000235] Las consecuencias funcionales de la delección de CISH se examinaron a continuación en células CB-NK iC9/CAR19/IL-15. Dado que CIS es un potente punto de control inmunológico en las células NK, se planteó la hipótesis

que la desactivación del gen CISH podría mejorar su función efectora de una manera similar al bloqueo de PD-1 en las células T. Para probar esta idea, se desarrolló primero un protocolo para la transducción retroviral combinada con el constructo iC9/CAR19/IL15 y la edición de genes mediada por ribonucleoproteína Cas9 (Cas9 RNP) para silenciar CISH. El día 7, las células NK transducidas con CAR se nucleofectaron con Cas9 solo (Cas9 simulado) o Cas9 precargado con dúplex crRNA: tracrRNA dirigido al exón 4 de CISH (CISH KO) (**FIGS. 7A-B**). La eficacia de transducción de iC9/CAR19/IL-15 y la viabilidad celular el día 7 fueron superiores al 90% y permanecieron estables a lo largo del tiempo (**FIG. 13**). La eficacia de CISH KO fue superior al 80% tanto en las células NY como en las células NK que expresan CAR según se evaluó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (**FIG. 7A**) y análisis Western Blot (**FIG. 7B**). Estos hallazgos también fueron confirmados por secuenciación de Sanger (**FIG. 7C**).

[000236] Para determinar el efecto de CISH KO sobre la actividad antitumoral de las células NK, se analizó la respuesta de las células NT y CB-NK e iC9/CAR19/IL-15 siete días después de la electroporación con Cas9 acoplado con un gRNA no objetivo (CTRL) o con Cas9 junto con gRNA dirigido al gen CISH (CISH KO) contra las células objetivo del linfoma Raji. Las células CISH KO CAR.NK produjeron cantidades significativamente más altas de IFN- γ y TNF- α , mostraron desgranulación mejorada (CD107a) y ejercieron una mayor citotoxicidad contra Raji en comparación con sus respectivos controles NT o iC9/CAR19/IL-15 (**FIGS. 8C**). En particular, entre todos los grupos, las células CISH KO iC9/CAR19/IL-15 CB-NK mostraron la mayor producción de citoquinas y citotoxicidad contra los objetivos de Raji, lo que respalda la idea que la combinación de la transducción de CAR con el silenciamiento de CISH da como resultado una función mejorada de las células NK (**FIGS. 8A- 8C**).

[000237] A continuación, se examinó el efecto de CISH KO sobre la formación de sinapsis inmunológica (IS) entre NT o las células NK iC9/CAR19/IL-15 y células Raji. La polarización del centro organizador de microtúbulos (MTOC) fue aumentada por CISH KO como se refleja por una distancia MTOC acortada a IS en comparación con los controles (**FIG. 8E**). En conjunto, estos hallazgos sugieren que CISH KO refuerza la sinapsis inmunológica entre las células NK (NT e iC9/CAR19/IL-15) y las células tumorales, lo que se correlaciona con una mayor función efectora y citotoxicidad.

[000238] Firma fenotípica y molecular de las células NK transducidas con CISH KO NT e iC9/CAR19/IL-15: para comprender el mecanismo por el cual CISH KO en las células NK aumenta su función contra las células tumorales, se utilizó citometría por tiempo de vuelo (CyToF) y un panel de 32 anticuerpos contra receptores inhibidores y activadores, así como marcadores de diferenciación, homing y activación, para comprender mejor su composición fenotípica. CISH KO en células NK iC9/CAR19/IL-15 indujo un fenotipo funcional con una expresión significativamente mayor de marcadores de citotoxicidad que incluyen granzima-b, perforina, TRAIL, CD3z, factores de transcripción y moléculas adaptadoras como Eomes, T-bet, DAP12, y la activación de correceptores/marcadores de proliferación tales como DNAM, CD25 y Ki67 en comparación con su contraparte de control (**FIG. 9A**). De manera similar, la delección de CISH en células NT NK dio como resultado una regulación positiva de varios marcadores de activación en comparación con las células NT NK de control (**FIG. 14A**). se utilizó viSNE, un algoritmo de inclusión de vecino estocástico distribuido en t (tSNE) para analizar más a fondo estos marcadores de células NK activadas después de CISH KO y se observó una segregación considerable entre las células NK de control y CISH KO iC9/CAR19/IL-15, con un fenotipo predominantemente activado (expresión aumentada de CD25, Ki67, CD3z,

perforina y granzima-b) dominando las células NK CISH KO iC9/CAR19/IL-15 (FIG. 9B).

[000239] A continuación, se realizó la secuenciación de RNA para
5 obtener una comprensión más profunda del perfil transcriptómico de células NK después de CISH KO. En particular, los resultados revelaron un perfil de expresión génica distinto entre CISH KO y células NK iC9/CAR19/IL-15 de control (FIG. 9C). CISH KO en células NT NK condujo a una regulación positiva de un número limitado de genes relacionados con genes estimulados por interferón (ISG) y
10 STAT-1, incluidos OSA-1, OSA-2 (FIGS. 14A-14C). Por el contrario, CISH KO en células NK iC9/CAR19/IL-15 condujo a una regulación positiva de múltiples genes relacionados con la activación de JAK/STAT y la ruta MAPK/ERK (FIG. 9).

[000240] Para obtener una mayor comprensión de la base mecanicista
15 del aumento de la función y la citotoxicidad inducida por CISH KO en iC9/CAR19/IL-15, se utilizó el análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes de células NK (GSEA) para identificar conjuntos de genes o rutas biológicas que podrían contribuir al fenotipo. El análisis reveló enriquecimiento en la señalización de INF- α , IFN- γ , IL-2/STAT5 e IL-6/STAT3, así como genes relacionados con la
20 respuesta inflamatoria (FIG. 9F). Los hallazgos se confirmaron a nivel de proteína mostrando una fosforilación mejorada de STAT5, STAT3 y fosfolipasa C gamma 1 (PLCg1) en células CISH KO iC9/CAR19/IL-15 CB-NK (FIG. 9G, H). Tomados en conjunto, estos datos indican que IL-15 impulsa la activación de CISH y que CISH KO en células NK iC9/CAR19/IL-15 induce una firma molecular compatible con un
25 fenotipo activado.

[000241] CISH KO reprograma el metabolismo de las células NK iC9/CAR19/IL-15: como se muestra en la FIG. 10A, los datos de la secuencia de RNA y los resultados de GSEA también mostraron la nueva observación que CISH

KO da como resultado un enriquecimiento en los genes mTORC1, hipoxia y glucólisis. La actividad de mTORC1 es esencial para la reprogramación glucolítica de las células NK activadas y se ha afirmado como un requisito previo para las funciones de las células NK efectoras. Por tanto, se buscó determinar si la

5 deleción de CISH modula la actividad metabólica de las células NK iC9/CAR19/IL-15. Se planteó la hipótesis que CISH KO mejora la actividad citotóxica de las células NK iC9/CAR19/IL-15 modulando su metabolismo y aumentando el consumo de oxígeno y glucosa. Para probar esta hipótesis, se realizaron una serie de ensayos Seahorse para medir las vías de energía en las células NK y

10 mostraron que, en respuesta al linfoma Raji, las células NK CISH KO iC9/CAR19/IL-15 tenían una mayor reserva glucolítica medida por una mayor tasa de acidificación extra celular (ECAR) en comparación con las células NK iC9/CAR19/IL-15 de control Cas9. Estos datos funcionales fueron respaldados por el análisis de la vía del ingenio (IPA) que muestra la regulación positiva de las

15 enzimas de glucólisis. Además, las células CISH KO iC9/CAR19/IL-15 NK mostraron un mayor consumo de glucosa en comparación con sus controles Cas9, como lo demuestra la prueba colorimétrica de glucosa realizada en el sobrenadante de células CAR-NK cocultivadas con células tumorales Raji durante 3 horas. Esto sugiere que CISH KO aumentó la actividad metabólica de las células

20 CAR-NK al mejorar su capacidad para consumir glucosa y utilizarla para la glucólisis. Además, las células NK CISH KO iC9/CAR19/IL-15 demostraron una mayor tasa de consumo de oxígeno (OCR) mediante el ensayo Seahorse en comparación con las células NK de control iC9/CAR19/IL-15. Esto indica que CISH KO también mejora el metabolismo de las células CAR-NK al acelerar su actividad

25 mitocondrial. De hecho, en una serie de estudios de microscopía confocal especializados, se observó que el número de mitocondrias y la relación de volumen mitocondrial/nuclear son significativamente mayores en las células CISH KO iC9/CAR19/IL-15 en comparación con los controles Cas9 (**FIG. 10**).

[000242] Con base a estos datos, se planteó la hipótesis que al aumentar la activación de JAK/STAT, CISH KO conduce a una actividad mejorada de MTORC1 y una regulación positiva de la actividad de HiF1a, culminando en una capacidad glucolítica aumentada y aptitud de las células NK. De hecho, se encontró que después del cocultivo con células Raji durante 2 horas, la fosforilación de la proteína ribosomal S6 (S6), un objetivo aguas abajo de la activación de la vía mTOR1, fue significativamente mayor en CISH KO iC9/CAR19/IL-15 en comparación con Cas9 control S.

[000243] **La combinación de la interrupción del punto de control CIS y la ingeniería iC9/CAR19/IL-15 mejora el control del tumor y la supervivencia en un modelo de ratón de linfoma Raji:** utilizando un modelo de ratón NSG de linfoma Raji agresivo (**FIG. 11A**), se investigó si la transferencia adoptiva de Las células CISH KO CB-NK podrían aumentar su control tumoral *in vivo*. Primero, los ratones recibieron una infusión i.v (10×10^6 /ratón) de células NT CB-NK de control que fueron electroporadas con Cas9 (Cas9 CTRL) o tenían CISH KO (5 ratones por grupo). El crecimiento del tumor se controló usando cambios en la formación de imágenes de bioluminiscencia tumoral (BLI) a lo largo del tiempo. La carga tumoral aumentó con el tiempo sin diferencias significativas en la supervivencia entre los grupos (**FIGS. 11B-C**), lo que sugiere que en ausencia de transducción de CAR, CISH KO no potencia la actividad de las células NK contra el tumor Raji. A continuación, se investigó el efecto *in vivo* de CISH KO sobre la actividad antitumoral de las células NK iC9/CAR19/IL-15. Dado que las células CISH KO iC9/CAR19/IL-15 son más potentes para matar las células tumorales objetivo incluso con proporciones bajas de E: T, se planteó la hipótesis que también serían más eficaces para controlar el tumor con dosis de infusión más bajas. De hecho, la infusión de tan pocas células como 3×10^6 , las

células CISH KO iC9/CAR19/IL-15 NK mejoró significativamente la supervivencia y el control del linfoma Raji en comparación con las células CTRL iC9/CAR19/IL-15 CB-NK, pero finalmente los ratones sucumben al tumor después de 46 días (**FIGS.** 11E-G). Cuando se infundió una dosis más alta de células CAR-NK 10×10^6 , el grupo que recibió células CISH KO no mostró ninguna evidencia de tumor por BLI (**FIG.** 11) o en la patología y mostró una supervivencia impresionantemente prolongada de hasta 341 días en comparación con las células CTRL iC9/CAR19/IL-15 CB-NK (**FIGS.** 11E-H, 16). Esto se asoció con una persistencia mejorada de las células NK en ratones que recibieron CISH KO iC9/CAR19/IL-15 en comparación con animales que recibieron células CTRL iC9/CAR19/IL-15 CB-NK (**FIG.** 11D). Es de destacar que CISH KO no se asoció con signos de mayor toxicidad en ratones, tales como pérdida de peso (**FIG.** 11I). Juntos, estos datos indican que silenciar CISH mejoró la capacidad de las células CB-NK iC9/CAR19/IL-15 para ejercer un control *in vivo* del tumor *in vivo* sin aumentar la toxicidad.

[000244] Traducción clínica de células NK CISH KO iC9/CAR19/IL-15 disponibles en el mercado para neoplasias malignas de células B recidivantes/refractarias: aunque no se encontró una mayor toxicidad *in vivo* en ratones tratados con células CISH KO CAR.NK, la mejora de la señalización de IL-15 puede potencialmente resultar en una mayor liberación de citoquinas inflamatorias. Por tanto, se usó caspasa inducible 9 (iC9) como gen suicida en el constructo para confirmar que las células NK transducidas con CAR CISH KO podrían inducirse a sufrir apoptosis en presencia de un dimerizador AP1903 de molécula pequeña. La adición de tan solo 10 nM de AP1903 a cultivos de células NK iC9/CAR.19/IL-15 indujo la apoptosis de las células NK transducidas en 4 h, y CISH KO no afectó la acción del dimerizador (**FIG.** 17A). El gen suicida también fue eficaz para eliminar las células CAR *in vivo* en células CISH KO y control

iC9/CAR.19/IL-15 CB-NK (**FIG. 16B**). Los ratones injertados con tumor Raji recibieron control o células CISH KO iC9/CAR.19/IL-15 CB-NK seguido de tratamiento con el dimerizador los días 7 y 9 después de la infusión de NK (n = 5 ratones por grupo). A continuación, los animales se sacrificaron el día 12. La administración del dimerizador de molécula pequeña dio como resultado una reducción notable de las células CB-NK iC9/CAR.19/IL-15 (tanto de control como CISH KO) en la sangre y los tejidos (hígado, bazo y médula ósea) de los ratones tratados (**FIGS. 17B-C**).

[000245] La identificación de inserciones/deleciones de nucleasa guiada por RNA (RGN) CRISPR fuera del objetivo (INDEL) es crucial antes que este enfoque pueda llevarse a la clínica. Por lo tanto, se utilizaron las tecnologías GuideSeq y Rhampseq para evaluar los efectos fuera del objetivo de los RNA guía CISH específicos utilizados en los experimentos. Los experimentos GuideSeq que utilizan células HEK293 que expresan constitutivamente nucleasa Cas9 identificaron múltiples sitios potenciales fuera del objetivo para ambos crRNA que se dirigen al locus CISH, y se observaron frecuencias incluso más altas de eventos fuera del objetivo con crRNA2 (**FIGS. 12A-B**).

[000246] En resumen, este es el primer informe de una estrategia de ingeniería genética que combina la transducción de CAR y el bloqueo del punto de control en células NK derivadas de sangre de cordón. Este producto de terapia celular NK está disponible en el mercado, es seguro y potente para eliminar las células tumorales CD19 + incluso en dosis bajas.

Ejemplo 4 - Material y métodos

[000247] Líneas celulares y medios de cultivo: se adquirió Raji (línea celular de linfoma de Burkitt) de American Type Culture Collection (Manassa, VA, EE.UU.). Las células alimentadoras basadas en K562 se transdujeron retrovíralmente para coexpresar 4-1BBL, CD48, y 9uAPC IL-21 unidas a la membrana. Las células Raji (Raji-FFLUC) transducidas con luciferasa de luciérnaga utilizada para los experimentos *in vivo* fueron amablemente proporcionadas por el Dr. Gianpietro Dotti (Universidad de Carolina del Norte).

[000248] Todas las líneas celulares se cultivaron en medio del Roswell Park Memorial Institute (RPMI) suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 5%, penicilina-estreptomicina al 1% y L-glutamina al 1%. Se cultivaron células NK en medio de crecimiento de células madre (SCGM) suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 5%, penicilina-estreptomicina al 1% y L-glutamina al 1%.

[000249] Expansión de células NK de sangre del cordón umbilical: las unidades CB para investigación fueron proporcionadas por el MD Anderson Cancer Center CB Bank. Los CB se aislaron mediante una técnica de gradiente de densidad (Ficoll-Histopaque; Sigma, St Louis, MO, EE. UU.). Las células NK CD56 +, purificadas con un kit de aislamiento de NK (Miltenyi Biotec, Inc., San Diego, CA, EE. UU.), se estimularon con uAPC irradiada (100 Gy) (proporción de células alimentadoras: NK 2:1) e IL-2 humana recombinante (Proleukin, 200 U/ml; Chiron, Emeryville, CA, EE. UU.) En medio de crecimiento de células madre completo (CellGenix GmbH, Freiburg, Alemania) el día 0. Las células NK activadas se transdujeron con sobrenadantes retrovirales el día +4 en placas revestidas de fibronectina humana (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, EE. UU.). El

día +7 y el día +14, las células NK se estimularon de nuevo con uAPC e IL-2 irradiadas. El día +21, se recogieron para uso células NK transducidas con CAR.

[000250] Transfección y transducción de retrovirus: los vectores

5 retrovirales que codifican iC9.CAR19.CD28-zeta-2A-IL-15 se han descrito previamente (Vera *et al.*, 2006). Se produjeron sobrenadantes retrovirales transitorios como se describió anteriormente (Vera *et al.*, 2006). Se transdujeron células NK activadas con sobrenadantes retrovirales el día +4 en placas recubiertas con fibronectina humana (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View,
10 CA, EE. UU.). Tres días después (día +7), se midió la eficacia de la transducción de CAR mediante citometría de flujo y se estimularon de nuevo las células NK con uAPC e IL-2 irradiadas.

[000251] La edición del gen CRISPR/Cas9 de CISH: el día +7 se

15 realizó CISH KO usando complejo de ribonucleoproteína (RNP), tanto en células NK transducidas con NT como con CAR. Las secuencias de protoespaciador para el gen CISH se identificaron mediante CRISPRscan (Moreno-Mateos *et al.*, 2015). Las plantillas de DNA para los gRNA se hicieron utilizando el protocolo descrito por Li *et al.* Se utilizaron dos gRNA dirigidos al exón 4 del gen CISH:
20 gRNA1:AGGCCACATAGTGCTGCACA (SEQ ID NO: 1), gRNA2: TGTACAGCAGTGGCTGGTGG (SEQ ID NO: 2). La proteína Cas9 (PNA bio) y el gRNA se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos en una reacción 1:1 con 10 ug de Cas9 y 10 ug de gRNA (5000 ng de sgRNA # 1 y 5000 ng de sgRNA # 2). El producto de incubación (gRNA y Cas9 unidos) se usó luego para
25 electroporar 1-2 millones de células NK transducidas con NT o CAR usando el sistema de transfección Neon (Thermo Fisher Scientific). Las condiciones de electroporación optimizadas fueron 1600 V, 10 ms, 3 pulsos, usando búfer T. A continuación, las diferentes preparaciones de células se cultivaron conjuntamente

con uAPC irradiada a una relación 1:2 (NK: uAPC) en medio SCGM con IL-2 200 U/ml.

[000252] PCR cuantitativa en tiempo real (RT Q-PCR): el RNA total

5 se aisló usando RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen Inc., Hilden, Alemania) y la síntesis de cDNA se realizó con ReadyScript cDNA Synthesis Mix (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las reacciones de PCR se realizaron en 20 µL; 10 µL de TaqMan 2X Advanced Fast PCR MasterMix (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, EE. UU.), 1 µL de
10 ensayo de expresión génica CISH TaqMan (Applied Biosystems), 2 µL de cDNA y 7 µL de agua sin nucleasas. Se han descrito las secuencias de cebadores y las condiciones de la PCR (Kolesnik *et al.*, 2013). La Q-PCR en tiempo real se realizó en un sistema de PCR en tiempo real rápido ABI 7500 (Applied Biosystems). Los niveles de mRNA se cuantificaron frente a las curvas estándar generadas usando
15 diluciones secuenciales de un oligonucleótido correspondiente a cada fragmento de PCR amplificado y usando el software 7500 Fast v2.3 (Applied Biosystems). La expresión relativa se determinó normalizando la cantidad de cada gen de interés para el gen de mantenimiento 18S.

20 **[000253] Western Blot:** se pretrataron células NK con MG132 10 µM

durante 4 h para bloquear la degradación proteasómica. Luego, las células NK se lisaron en búfer de lisis (IP Lysis Buffer, Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL) suplementado con inhibidores de proteasa (Complete Mini, tabletas de cóctel sin EDTA, Roche Holding, Basilea, Suiza) y se incubaron durante 30 min en hielo. Las
25 concentraciones de proteína se determinaron mediante el ensayo BCA (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL). Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anticuerpo CIS (Clon D4D9) y anticuerpo B-actina (Clon 8H10D10), ambos anticuerpos se obtuvieron de Cell Signaling Technology.

[000254] Medición de las frecuencias de modificación de alelos mediante PCR y secuenciación de Sanger: se extrajo y purificó el DNA (QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen Inc., Hilden, Alemania) de células NT NK expandidas *ex vivo* y transducidas con CAR (control y condiciones CISH KO). Los cebadores de PCR utilizados para la amplificación del locus objetivo fueron los siguientes:

Cebador (primer) directo del exón 4: CGTCTGGACTCCAACTGCTT (SEQ ID NO: 7)

10 Cebador (primer) inverso del exón 4: GTACAAAGGGCTGCACCAGT (SEQ ID NO: 8)

[000255] Los productos de PCR purificados se enviaron para secuenciación de Sanger en las instalaciones centrales del MD Anderson utilizando ambos cebadores de PCR, y se analizó cada cromatograma de
15 secuencia.

[000256] Ensayo funcional: el día 14 o el día 21 de cultivo, las células NT expandidas *ex vivo* (control o CISH KO) de control y las células NK CAR19/IL-15 (control o CISH KO) a 100 x 10e3 células/pozo fueron co-cultivadas en
20 presencia de Brefeldin A durante 6 h en placas de 96 pozos de fondo redondo con células Raji o dianas K562 (control positivo) a una relación de células efectoras: objetivo (E: T) de 2:1. Para medir la desgranulación, se añadió a los pozos el anticuerpo CD107a (Anticuerpo Brilliant Violet 785™ anti-CD107a humano (LAMP-1), Biolegend, San Diego, CA, EE.UU.) al comienzo del cocultivo. La
25 desgranulación medida por CD107a y producción de citoquinas intracelulares (TNFα (Anticuerpo Monoclonal TNF Alfa (MAb11), Alexa Flúor 700, eBioscience Inc., San Diego, CA, EE. UU.) E IFN-γ (BD Horizon™ V450 Mouse Anti-Human

IFN- γ , BD Biosciences, San José, CA, EE. UU.) Se evaluaron mediante citometría de flujo como se describió anteriormente (Rouce *et al.*, 2016)

[000257] Ensayo de liberación de cromo: para evaluar la
5 citotoxicidad, se cultivaron conjuntamente células NT NK expandidas *ex vivo* (control y CISH KO) y transducidas con CAR (control y CISH KO) con dianas Raji marcadas con ^{51}Cr en múltiples proporciones E: T; La citotoxicidad se midió mediante la liberación de ^{51}Cr como se describió anteriormente (Rouce *et al.*, 2016).

10

[000258] Microscopía confocal para estudiar la sinapsis inmunológica: se conjugaron $0,5 \times 10^6$ células efectoras, como se describió anteriormente, con $0,25 \times 10^6$ células Raji en 250 ml de SCGM con medio que contiene FBS al 10% inactivado por calor, durante 40 minutos a 37°C y se tiñeron
15 como se demostró en otra parte. (Banarjee *et al.*, 2010). Brevemente, después de la incubación, las células se adhirieron a un portaobjetos revestido con Poli-A-Lisina (Electron Microscopy Sciences) y se tiñeron para las proteínas de interés. Se utilizó el fragmento F(AB`2) del anticuerpo (H + L) de IgG antihumano de cabra purificado por afinidad Alexa Flúor 647 para detectar CAR. Se utilizo Alexa Flúor
20 (AF) 488 anti-CD19 (clon HIB19, BD BioSciences), Phalloidin AF 568 (Invitrogen) para la detección de F-actina y anti-Perforin 488 (clon δ G9; BioLegend). Los conjugados se montaron en medios que contienen anti-desvanecimiento (Prolong gold, Invitrogen) y se obtuvieron imágenes mediante barrido secuencial con un microscopio confocal de disco giratorio Yokogawa equipado con una cámara Zyla
25 4.2sCMOS y con un objetivo de 63x. Las imágenes se exportaron a Imaris (Bitplane) para realizar mediciones cuantitativas. La distancia desde el centroide de perforina a la sinapsis se mide como se describió anteriormente

Citometría de masas

[000259] Conjugación de anticuerpo: se usó un panel que comprende 38 anticuerpos marcados con metal para la caracterización en profundidad de las células NK. La lista de anticuerpos con los isótopos de etiqueta metálica correspondientes. Todos los anticuerpos no marcados se compraron sin portador y se conjugaron internamente con la etiqueta metálica correspondiente utilizando polímero Maxpar X8 según las instrucciones del fabricante (Fludigm). Todos los isótopos metálicos se adquirieron de Fludigm excepto el cloruro de indio (III) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). La concentración de anticuerpo se determinó midiendo la cantidad de proteína A280 usando Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Los anticuerpos conjugados se diluyeron luego en una solución de estabilización de anticuerpos basada en PBS o LowCross-Buffer (Candor Bioscience GmbH, Wangen, Alemania) suplementado con azida sódica al 0,05% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) hasta una concentración final de 0,5 mg/ml. Se realizaron experimentos de titulación en serie para determinar la concentración con la relación señal/ruido óptimo para cada anticuerpo.

[000260] Preparación y adquisición de la muestra: se recolectaron células NT NK (Control o CISH KO) y células NK transducidas con CAR (Control o CISH KO), se lavaron dos veces con búfer de tinción celular (albúmina de suero bovino al 0,5%/PBS) y se incubaron con 5 µl de solución de bloqueo del receptor de Fc humano (Trustain FcX, Biolegend, San Diego, CA) durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células se tiñeron con una mezcla de anticuerpos recién preparada contra los marcadores de la superficie celular durante 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador (100 rpm). Durante los últimos 3 minutos de incubación, las células se incubaron con cisplatino 2,5 µM (Sigma Aldrich, St Louis, MO), se lavaron dos veces con búfer de tinción celular y

se fijaron/permeabilizaron usando una solución BD Cytofix/Cytoperm durante 30 minutos en oscuridad a 4°C. Las células se lavaron dos veces con perm/búfer de lavado, se tiñeron con anticuerpos dirigidos contra marcadores intracelulares y, después de un paso de lavado adicional, se almacenaron durante la noche en 500
5 µl de paraformaldehído al 1,6% (EMD Biosciences) /PBS con intercalador de ácido nucleico de iridio 125 nM (Fluidigm). Al día siguiente, las muestras se lavaron dos veces con bufer de tinción celular, se resuspendieron en 1 ml de MilliQ dH2O, se filtraron a través de una malla de nylon de 35 µm (tubos con tapa de colador de células, BD, San José, CA) y se contaron. Antes del análisis, las muestras se
10 suspendieron en MilliQ dH2O complementado con perlas de calibración de cuatro elementos EQ™ a una concentración de 0,5x10⁵/ml. Las muestras se adquirieron a 300 eventos/segundo en un instrumento Helios (Fluidigm) utilizando el software de adquisición Helios 6.5.358 (Fluidigm).

15 **[000261] Análisis de datos:** Los datos de citometría de masas se normalizaron basándose en el cambio de señal de cuatro elementos EQ™ a lo largo del tiempo usando el software de normalización Fluidigm 2. El control de calidad de los datos inicial se realizó usando Flowjo versión 10.2. Se separaron las perlas de calibración y se eligieron singletes en función de la tinción con iridio 193
20 y la duración del evento. Las células muertas fueron excluidas por el canal Pt195 y se realizó un control adicional para seleccionar células CD45+ y luego la población de células NK de interés (CD3-CD56+). Se tomaron muestras proporcionalmente de un total de 320.000 células de todas las muestras para realizar agrupaciones automatizadas. Los datos se analizaron utilizando la reducción de dimensión
25 automatizada que incluye (viSNE) en combinación con FlowSOM para la agrupación para el fenotipado profundo de las células inmunes como se publicó anteriormente (Van Gassen *et al.*, 2015).

[000262] Secuenciación de RNA: se extrajo y purificó RNA (RNeasy Plus Mini Kit, Qiagen) de células NT NK transducidas con CAR y expandidas *ex vivo* (condiciones de control y CISH KO) y se envió para la secuencia de RNA a Novogene, donde se realizó el control de calidad, el constructo y secuenciación de la biblioteca. El análisis de los datos de RNAseq fue realizado por el departamento de Bioinformática del MD Anderson. Las lecturas de secuenciación se alinearon con el genoma de referencia humano (hg38) usando TOPHAT2 v2.0.13 (Kim *et al.*, 2013). Los niveles de expresión génica se midieron contando las lecturas mapeadas usando HTSEQ basado en el modelo génico hg38 GENCODE v25. Los genes expresados diferencialmente se identificaron utilizando el paquete EdgeR, con un límite de FDR (tasa de descubrimiento falso) <0,01 y cambio de veces > 2 (Robinson *et al.*, 2010).

Imágenes de mitocondrias y lisosomas

[000263] Marcado de células NK: las células NK se incubaron a 37°C durante 40 minutos en una solución 1:1 (v/v) de bufer de tinción de células vivas (abcam) y RPMI (Corning) que contiene concentraciones finales de 500 nM MitoTracker™ Deep Red FM (Invitrogen™), LysoRed 250 nM (abcam) y Hoechst 33342 (Sigma) 1 µM para marcar mitocondrias, lisosomas y núcleos, respectivamente. A continuación, las células se lavaron con solución salina equilibrada de Hanks (Cellgro) + HEPES al 10% (Corning) primero y medio de cultivo completo RPMI + FBS al 10% (R10) para el segundo lavado.

[000264] Microscopía confocal: se cargaron 50.000 células NK en pozos individuales de una placa de 96 fondos de vidrio. Se utilizó un microscopio invertido Nikon A1/TiE equipado con un objetivo 100x, 1,45 NA para la obtención de imágenes. Se tomaron imágenes 3D (pilas z, pasos de 0,3 µm, ~ 40 cortes) de

diferentes campos de visión utilizando canales DAPI (404,0 nm), TXRed (561,8 nm) y Cy5 (641,0 nm).

[000265] Análisis de imágenes confocales: se extrajeron pilas Z de
5 imágenes de 16 bits para cada canal y se procesaron en ImageJ (National
Institutes of Health (NIH), EE. UU.) Utilizando una serie de complementos.
Primero, las imágenes se segmentaron para cada canal antes de aplicar un
umbral. A continuación, se aplicó el complemento 3D Objects Counter a la imagen
para determinar las regiones de interés (ROI) mitocondriales y lisosomas. Estos
10 ROI se superpusieron a la imagen original y las mediciones se recopilaron
posteriormente. De manera similar, el complemento 3D Objects Counter también
se usó en el núcleo, pero solo se usó la imagen original. Por último, el seguimiento
del movimiento de una sola célula se realizó utilizando el complemento
TrackMate1 para filtrar las celdas inestables en su movimiento. Todas las medidas
15 se consolidaron en R, donde las mitocondrias, el lisosoma y el núcleo se
emparejaron con su célula correspondiente.

[000266] Modelos de linfoma xenogénico: Para evaluar el efecto
antitumoral de células CB-NK transducidas con CAR *in vivo*, usamos un modelo
20 de xenoinjerto NOD/SCID IL-2R γ null (NSG), con la línea celular Raji agresiva
resistente a NK. Los experimentos con ratones se realizaron de acuerdo con las
recomendaciones de los NIH según los protocolos aprobados por el Comité
Institucional de Cuidado y Uso de Animales. Se irradiaron ratones NSG (10-12
semanas de edad; Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, EE. UU.) Con 300 cGy
25 el día 1 y se inocularon por vía intravenosa con células Raji marcadas con
luciferasa de luciérnaga (2×10^4) el día 0. Cuando fue indicado se inyectaron
células NT expandidas frescas (control o CISH KO) o CB-NK traslucidas con CAR
(control o CISH KO) a través de la vena de la cola el día 0. Los ratones se

sometieron a imágenes de bioluminiscencia semanales (Xenogen-IVIS 200 Imaging system; Caliper, Waltham, MA, Estados Unidos). La cuantificación de la señal en fotones/segundo se realizó determinando la tasa de flujo de fotones dentro de las regiones estandarizadas de interés utilizando el software Living Image (Caliper). El tráfico, la persistencia y la expansión de las células NK se midieron mediante citometría de flujo.

[000267] Activación del gen suicida *in vitro* y validación *in vivo*: Se

añadió el dimerizador de molécula pequeña AP1903 (10 nM) a cultivos de células CB-NK durante 4 h. La eliminación de las células transducidas se evaluó mediante tinción con anexina-V/vivo muerto. La eficacia del gen suicida también se probó *in vivo* mediante el tratamiento de ratones portadores de tumores que habían recibido células NK iC9/CAR.19/IL-15 + (control o CISH KO) con dos dosis de AP1903 (50 µg cada una) por vía intraperitonealmente, separados 2 días, en los días 7 y 9. Otros dos grupos de ratones (control y CISH KO) sirvieron como control sin tratamiento con AP1903. Todos los ratones se sacrificaron el día 12 y se recogieron y procesaron sangre y órganos (hígado, bazo y médula ósea) y se realizó una citometría de flujo para determinar la fracción CAR-NK y la viabilidad.

[000268] Identificación fuera del objetivo: se empleó el método

GUIDE-seq para el descubrimiento imparcial de eventos de edición fuera del objetivo (Tsai *et al.*, 2015). En este estudio, las células HEK293 que expresan constitutivamente la nucleasa de *S. pyogenes* Cas9 (células “HEK293-Cas9”) fueron la fuente de Cas9. Los complejos Alt-R® gRNA se formaron combinando Alt-R tracrRNA y Alt-R crRNA XT en una relación molar 1:1. Los complejos de gRNA se administraron mediante nucleofección utilizando el sistema Shuttle™ de 96 pozos Nucleofector™ Amaxa™ (Lonza, Basilea, Suiza). Para cada nucleofección, se lavaron $3,5 \times 10^5$ células HEK293-Cas9 con 1X PBS, se

resuspendieron en 20 µl de solución SF (Lonza) y se combinaron con 10 µM de gRNA junto con 0,5 µM de fragmento de donante de dsDNA de GUIDE-seq. Esta mezcla se transfirió a un pozo de una placa Nucleocuvette™ (Lonza) y se sometió a electroporación usando el protocolo 96-DS-150. El DNA se extrajo 72 horas después de la electroporación utilizando el kit de purificación de DNA genómico GeneJET (Thermo Fisher Scientific). La preparación, secuenciación y operación de la biblioteca NGS del software GUIDE-seq se realizó como se describió anteriormente, excepto que se incorporó la alineación Needleman-Wunch (Tsai *et al.*, 2016).

[000269] Enriquecimiento del objetivo mediante rhAmpSeq para PCR multiplexada: Para cuantificar mejor la edición en sitios fuera del objetivo encontrados usando GUIDE-seq, se realizó PCR multiplex acoplada a amplicón NGS usando rhPCR (PCR ejecutada en presencia de RNaseH2) (Dobosy *et al.*, 2011) con cebadores escindibles bloqueados. Los cebadores se diseñaron mediante un algoritmo (IDT) para la comparación cruzada de cebadores y la selección basada en la compatibilidad con otros cebadores en el múltiplex. Esta tecnología de amplificación requiere que el cebador se hibride adecuadamente con un sitio objetivo antes de la amplificación. Las discrepancias entre el objetivo y el cebador evitan el desbloqueo, lo que aumenta la especificidad y elimina los dímeros de los cebadores. Este enfoque permite la producción eficiente de amplicones de PCR altamente multiplexados en un solo tubo. Para estos experimentos, se administraron complejos de gRNA en células HEK293-Cas9 como se describió anteriormente o se complejaron con la nucleasa v3 Alt-R HiFi Cas9 para formar un complejo de ribonucleoproteína activa (RNP) que luego se nucleofectó directamente en células HEK293 a 2 µM junto con 2 µM de potenciador de electroporación (IDT) Alt-R Cas9. El DNA se extrajo 48 horas después de la electroporación usando una solución de extracción de DNA

QuickExtract (epicentro). Se realizó una amplificación específica de locus con cebadores rh durante 10 ciclos, seguido de una limpieza de perlas SPRI 1,5x. Se realizó una ronda de indexación de PCR durante 18 ciclos para incorporar índices P5 y P7 de muestra única seguida de una limpieza de perlas de 1x SPRI y una

5 cuantificación de la biblioteca mediante qPCR (IDT). Los amplicones de PCR se secuenciaron en un instrumento Illumina MiSeq (química v2, lecturas de extremos emparejados de 150 bp) (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.). Los datos se analizaron mediante una canalización personalizada. Los datos se demultiplexaron (herramientas Picard v2.9); las lecturas directas e inversas se fusionaron en

10 amplicones extendidos (flash v1.2.11) (Magoc *et al.*, 2011); las lecturas se alinearon con la referencia genómica GRCh38 (bwa mem v0.7.15) y se asignaron a los objetivos en el grupo de cebadores multiplex (etiquetas de bedtools v2.25) (Quinlan *et al.*, 2010). Se filtraron las lecturas con cualquier puntuación de calidad base <10. En cada objetivo, la edición se calculó como el porcentaje de lecturas

15 totales que contienen un INDEL dentro de una ventana de 10 bp del sitio de corte.

[000270] Estadísticas: se utilizó la prueba Anova bidireccional para comparar diferencias cuantitativas (media $\pm$ s.d.) entre grupos; Los valores de p fueron bilaterales y $P < 0,05$ se consideró significativo. Para todos los

20 experimentos de bioluminiscencia, las señales de intensidad se resumieron como medias $\pm$ s.d. en la línea de base y en múltiples puntos de tiempo posteriores para cada grupo de ratones (Shah *et al.*, 2013). Las probabilidades de supervivencia se calcularon mediante el método de Kaplan-Meier. Las pruebas estadísticas indicadas se realizaron utilizando el software Prism (GraphPad versión 7.0c). Para

25 el análisis de microscopía confocal, los conjuntos de datos se analizaron utilizando una prueba de cola en T no apareada. Los datos presentan una media $\pm$ el 95% del intervalo de confianza. Las imágenes se ensamblaron utilizando ImageJ.

* * *

[000271] Todos los métodos descritos y reivindicados en el presente documento pueden realizarse y ejecutarse sin experimentación indebida a la luz de la presente divulgación. Si bien las composiciones y métodos de esta invención se han descrito en términos de implementaciones preferidas, será evidente para los versados en el arte que se pueden aplicar variaciones a los métodos y en las etapas o en la secuencia de etapas del método descrito. en este documento sin apartarse del concepto, espíritu y alcance de la invención. Más específicamente, será evidente que ciertos agentes que están relacionados tanto química como fisiológicamente pueden ser sustituidos por los agentes descritos en el presente documento, a la vez que se conseguirían resultados iguales o similares. Todos estos sustitutos y modificaciones similares evidentes para los versados en el arte se consideran dentro del espíritu, alcance y concepto de la invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

15

REFERENCIAS

Las siguientes referencias, en la medida en que proporcionen un procedimiento ejemplar u otros detalles complementarios a los expuestos en este documento, se incorporan específicamente en este documento como referencia.

20

Austin-Ward and Villaseca, *Revista Médica de Chile*, 126(7):838-845, 1998.

Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994.

25

Banerjee *et al.*, *J Immunol Methods* 355(1-2): 1-13, 2010.

Bennekov *et al.*, *Mt. Sinai J. Med.* 71 (2): 86-93, 2004.

Bukowski *et al.*, *Clinical Cancer Res.*, 4(10):2337-2347, 1998.

- Camacho *et al.* *J Clin Oncology* 22(145): Abstract No. 2505 (antibody CP-675206), 2004.
- Campbell, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 298: 23-57, 2006.
- Chothia *et al.*, *EMBO J.* 7:3745, 1988.
- 5 Christodoulides *et al.*, *Microbiology*, 144(Pt 11):3027-3037, 1998.
- Cohen *et al.* *J Immunol.* 175:5799-5808, 2005.
- Daher *et al.*, *Curr Opin Immunol* 51:146-53, 2018.
- Davidson *et al.*, *J. Immunother.*, 21(5):389-398, 1998.
- Davila *et al.* *PLoS ONE* 8(4): e61338, 2013.
- 10 Dobosy *et al.*, *BMC Biotechnol* 11:80, 2011.
- Doulatov *et al.*, *Cell Stem Cell.* 10:120-36, 2012.
- European patent application number EP2537416
- Fedorov *et al.*, *Sci. Transl. Medicine*, 5(215), 2013.
- Frolet *et al.*, *BMC Microbiol.* 10:190 (2010).
- 15 Gaj *et al.*, *Trends in Biotechnology* 31(7), 397-405, 2013.
- Gay *et al.*, *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 17(8): 471-8, 2017.
- Hanibuchi *et al.*, *Int. J. Cancer*, 78(4):480-485, 1998.
- Hartmann *et al.*, *EMBO Mol Med* 9(9): 1183-97, 2017.
- Heemskerk *et al.* *Hum Gene Ther.* 19:496-510, 2008.
- 20 Hellstrand *et al.*, *Acta Oncologica*, 37(4):347-353, 1998.
- Hollander, *Front. Immun.*, 3:3, 2012.
- Hubert *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 14523-28, 1999.
- Hui and Hashimoto, *Infection Immun.*, 66(11):5329-5336, 1998.
- Hurwitz *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* 95(17): 10067-10071, 1998.
- 25 Publicación de Patente Internacional No. WO 00/37504
- Publicación de Patente Internacional No. WO 01/14424
- Publicación de Patente Internacional No. WO 2007/069666
- Publicación de Patente Internacional No. WO 2007/069666

Publicación de Patente Internacional No. WO 98/42752

Publicación de Patente Internacional No. WO/2014055668

Publicación de Patente Internacional No. WO1995001994

Publicación de Patente Internacional No. WO1998042752

5 Publicación de Patente Internacional No. WO2000037504

Publicación de Patente Internacional No. WO200014257

Publicación de Patente Internacional No. WO2001014424

Publicación de Patente Internacional No. WO2006/121168

Publicación de Patente Internacional No. WO2007/103009

10 Publicación de Patente Internacional No. WO2009/101611

Publicación de Patente Internacional No. WO2009/114335

Publicación de Patente Internacional No. WO2010/027827

Publicación de Patente Internacional No. WO2011/066342

Publicación de Patente Internacional No. WO2012/129514

15 Publicación de Patente Internacional No. WO2013/071154

Publicación de Patente Internacional No. WO2013/123061

Publicación de Patente Internacional No. WO2013/166321

Publicación de Patente Internacional No. WO2013126726

Publicación de Patente Internacional No. WO2014/055668

20 Publicación de Patente Internacional No. WO2014031687

Publicación de Patente Internacional No. WO2015016718

Publicación de Patente Internacional No. WO99/40188

Janeway *et al*, Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 3rd Ed., Current Biology Publications, p. 433, 1997.

25 Johnson *et al*. *Blood* 114:535-46, 2009.

Jores *et al*., *PNAS U.S.A.* 87:9138, 1990.

Kim *et al*., *Genome biology* 14(4): R36, 2013.

Kim *et al*., *Nature Biotechnology* 31, 251-258, 2013.

- Kirchmaier and Sugden, *J. Virol.*, 72(6):4657–4666, 1998.
- Kolesnik *et al.*, *Methods Mol Biol* 967: 235-48, 2013.
- Leal, M., *Ann N Y Acad Sci* 1321, 41-54, 2014.
- Lefranc *et al.*, *Dev. Comp. Immunol.* 27:55, 2003.
- 5 Li *et al. Nat Biotechnol.* 23:349-354, 2005.
- Li *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4275-4279, 1992.
- Linnemann, C. *et al. Nat Med* 21, 81–85, 2015.
- Lockey *et al.*, *Front. Biosci.* 13:5916-27, 2008.
- Loewendorf *et al.*, *J. Intern. Med.* 267(5):483-501, 2010.
- 10 Ludwig *et al. Nature Biotech.*, (2):185-187, 2006a.
- Ludwig *et al. Nature Methods*, 3(8):637-646, 2006b.
- Magoc *Bioinformatics* 27(21): 2957-63, 2011.
- Marschall *et al.*, *Future Microbiol.* 4:731-42, 2009.
- Mehta *et al.*, *Front Immunol* 9: 283, 2018.
- 15 Mokyry *et al. Cancer Res* 58:5301-5304, 1998.
- Moreno-Mateos *et al.*, *Nat Methods* 12(10): 982-8, 2015.
- Notta *et al.*, *Science*, 218-221, 2011.
- Pardoll, *Nat Rev Cancer*, 12(4): 252-64, 2012
- Parkhurst *et al. Clin Cancer Res.* 15: 169-180, 2009.
- 20 Qin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(24):14411-14416, 1998.
- Quinlan *et al.*, *Bioinformatics* 26(6): 841-2, 2010.
- Rieder *et al.*, *J. Interferon Cytokine Res.* (9):499-509, 2009.
- Robinson *et al.*, *Bioinformatics* 26(1): 139-40, 2010.
- Rouce *et al.*, *Leukemia* 30(4): 800-11, 2016.
- 25 Rykman, *et al.*, *J. Virol.* 80(2):710-22, 2006.
- Sadelain *et al.*, *Cancer Discov.* 3(4): 388-398, 2013.
- Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001.

Shah *et al.*, *PLoS One* 8(10): e76781, 2013.

Singh *et al.*, *Cancer Research*, 68:2961-2971, 2008.

Singh *et al.*, *Cancer Research*, 71:3516-3527, 2011.

Takahashi *et al.*, *Cell*, 126(4):663-76, 2007.

5 Terakura *et al.* *Blood*. 1:72- 82, 2012.

Tsai *et al.*, *Nat Biotechnol* 33(2): 187-97, 2015.

Tsai *et al.*, *Nat Biotechnol* 34(5): 483, 2016.

Turtle *et al.*, *Curr. Opin. Immunol.*, 24(5): 633-39, 2012.

Patente de los EE. UU. No. 4,870,287

10 Patente de los EE. UU. No. 5,739,169

Patente de los EE. UU. No. 5,760,395

Patente de los EE. UU. No. 5,801,005

Patente de los EE. UU. No. 5,824,311

Patente de los EE. UU. No. 5,830,880

15 Patente de los EE. UU. No. 5,844,905

Patente de los EE. UU. No. 5,846,945

Patente de los EE. UU. No. 5,885,796

Patente de los EE. UU. No. 5,994,136

Patente de los EE. UU. No. 6,013,516

20 Patente de los EE. UU. No. 6,103,470

Patente de los EE. UU. No. 6,207,156

Patente de los EE. UU. No. 6,225,042

Patente de los EE. UU. No. 6,355,479

Patente de los EE. UU. No. 6,362,001

25 Patente de los EE. UU. No. 6,410,319

Patente de los EE. UU. No. 6,416,998

Patente de los EE. UU. No. 6,544,518

Patente de los EE. UU. No. 6,790,662

- Patente de los EE. UU. No. 7,109,304
- Patente de los EE. UU. No. 7,442,548
- Patente de los EE. UU. No. 7,446,190
- Patente de los EE. UU. No. 7,598,364
- 5 Patente de los EE. UU. No. 7,989,425
- Patente de los EE. UU. No. 8,008,449
- Patente de los EE. UU. No. 8,017,114
- Patente de los EE. UU. No. 8,058,065
- Patente de los EE. UU. No. 8,071,369
- 10 Patente de los EE. UU. No. 8,119,129
- Patente de los EE. UU. No. 8,129,187
- Patente de los EE. UU. No. 8,183,038
- Patente de los EE. UU. No. 8,268,620
- Patente de los EE. UU. No. 8,329,867
- 15 Patente de los EE. UU. No. 8,354,509
- Patente de los EE. UU. No. 8,546,140
- Patente de los EE. UU. No. 8,691,574
- Patente de los EE. UU. No. 8,735,553
- Patente de los EE. UU. No. 8,741,648
- 20 Patente de los EE. UU. No. 8,900,871
- Patente de los EE. UU. No. 9,175,268
- Patente de los EE. UU. No. 2010/0210014
- Patente de los EE. UU. No. 12/478,154
- Patente de los EE. UU. No. 2002131960
- 25 Patente de los EE. UU. No. 2003/0211603
- Patente de los EE. UU. No. 2005/0260186
- Patente de los EE. UU. No. 2006/0104968
- Patente de los EE. UU. No. 2009/0004142

- Patente de los EE. UU. No. 2009/0017000
- Patente de los EE. UU. No. 2009/0246875
- Patente de los EE. UU. No. 2011/0104125
- Patente de los EE. UU. No. 2011/0301073
- 5 Patente de los EE. UU. No. 20110008369
- Patente de los EE. UU. No. 2012/0276636
- Patente de los EE. UU. No. 2013/0315884
- Patente de los EE. UU. No. 20130149337
- Patente de los EE. UU. No. 2013287748
- 10 Patente de los EE. UU. No. 2014/0120622
- Patente de los EE. UU. No. 2014022021
- Patente de los EE. UU. No. 20140294898
- Van Gassen *et al.*, *Cytometry* 87(7): 636-45, 2015.
- Varela-Rohena *et al.* *Nat Med.* 14: 1390-1395, 2008.
- 15 Vera *et al.*, *Blood* 108(12): 3890-7, 2006.
- Wang *et al.* *J Immunother.* 35(9):689-701, 2012.
- Wu *et al.*, *Adv. Cancer Res.*, 90: 127-56, 2003.
- Wu *et al.*, *Cancer*, 18(2): 160-75, 2012.
- Yamanaka *et al.*, *Cell*, 131(5):861-72, 2007.
- 20 Yu *et al.*, *Science*, 318:1917-1920, 2007.
- Zysk *et al.*, *Infect. Immun.* 68(6):3740-43, 2000.