

RECEPTORES NKG2D NO NATURALES QUE NO SEÑALIZAN DIRECTAMENTE LAS CÉLULAS A LAS QUE SE UNEN

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La solicitud se refiere en general a un ectodominio no natural de un receptor NKG2D no natural unido a una célula de mamífero en donde el receptor no activa directamente ni señala directamente la célula de mamífero cuando se une a un ligando NKG2D no natural modificado para unirse en específico al receptor NKG2D no natural y al que moléculas heterólogas se unen a los dominios $\alpha 1$ - $\alpha 2$ modificados de ligando NKG2D.

INFORMACIÓN ANTECEDENTE

NKG2D es un receptor de activación expresado como una proteína integral homodimérica tipo II en la superficie de los linfocitos citolíticos naturales (NK) y de ciertas células T y macrófagos. Cuando se une a uno de sus ocho ligandos naturales expresados principalmente en la superficie de células estresada, el NKG2D activa la célula NK para aniquilar la célula estresada, o cuando está en las células T, el NKG2D ocupado por ligando co-estimula una célula T activada para llevar a cabo su función efectora. Se han solucionado las estructuras tridimensionales del ectodominio del NKG2D natural humano, varios de sus ligandos naturales solubles y, en algunos casos, el complejo unido de ligando soluble y el ectodominio de receptor. Los dominios $\alpha 1$ - $\alpha 2$ monoméricos de ligandos NKG2D se unen en específico a los dos ectodominios del homodímero de NKG2D natural.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

[0002] La presente descripción se refiere a receptores NKG2D no naturales unidos a superficies celulares de mamífero en donde los receptores no naturales no señalizan directamente ni activan directamente la célula cuando el receptor se une por dominios $\alpha 1$ - $\alpha 2$ no naturales cognados de ligandos

NKG2D modificados para unirse en específico a los receptores NKG2D no naturales. Los dominios $\alpha 1$ - $\alpha 2$ no naturales de los ligandos NKG2D se pueden unir a moléculas o átomos heterólogos, incluyendo polipéptidos, en algunas modalidades citocinas o citocinas modificadas, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos. La activación directa de, o la señalización directa a la célula no se media por el receptor NKG2D no natural unido y no se presenta incluso cuando se han presentado sinapsis inmunológicas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0003] Figuras 1A-1B: (figura 1A) Alineación del ectodominio de NKG2D.wt natural (SEQ ID NO: 17) junto con las variantes naturales de NKG2D.YA (SEQ ID NO: 18) y NKG2D.AF (SEQ ID NO: 25). Se indican las ubicaciones Y152 e Y199 y se resaltan en gris los residuos mutados presentes en las variantes no naturales. (figura 1B) Alineación del dominio $\alpha 1$ - $\alpha 2$ de ULBP2 tipo natural/silvestre (SEQ ID NO: 4) y variantes no naturales de ULBP2 incluyendo ULBP2.R80W (SEQ ID NO: 108). Se resaltan en gris los residuos críticos para la unión de las variantes no naturales de ULBP2 a los receptores no naturales NKG2D.YA o NKG2D.AF. Se indican las ubicaciones del residuo R80 así como la región de M154-F159 que se exploró para variantes ortogonales que se unen a NKG2D.YA (ULBP2.S3, SEQ ID NO: 127) o NKG2D.AF (ULBP2.C, SEQ ID NO: 111; ULBP2.R, SEQ ID NO.: 113; ULBP2.AA, SEQ ID NO.: 115; y ULBP2.AB, SEQ ID NO.: 117).

[0004] Figura 2: Comparación de cromatografía de exclusión por tamaño de las proteínas de fusión de Fc-NKG2D no natural analizadas en una columna Akta HiLoad 16/600 Superdex 200. La migración del material correctamente ensamblado se ejemplificó por un pico discreto y simétrico que eluyó a volúmenes más altos, en tanto que el material agregado se eluyó antes a volúmenes más bajos. El sitio y la naturaleza de las modificaciones se indican por los números de aminoácidos Y152, Y199, o ambos (SEQ ID NO: 48, 43, 42, 58, 41, y 40 empezando a partir de la parte superior de la figura).

[0005] Figura 3: Los perfiles de cromatografía de exclusión por tamaño de las variantes de Fc-eNKG2D no natural con uno o dos cambios de aminoácidos se analizaron en una columna Akta Superdex 200 Increase 10/300 GL. La migración del material correctamente ensamblado se ejemplifica por un pico

discreto y simétrico que se eluye a volúmenes más altos, en tanto que el material agregado, caracterizado por un pico amplio de baja amplitud o una serie de picos, se eluye a volúmenes más bajos. Las letras entre paréntesis representan los aminoácidos en las posiciones 152 y 199 (SEQ ID NO: 57, 56, 55, 54, 53, 52, 51, 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, y 40 en orden desde la parte de arriba), respectivamente.

[0006] Figura 4: Unión de ELISA de MicAbodies ULBP2 tipo silvestre, MICwed- y MIC25-rituximab a candidatos de Fc-eNKG2D. La clave se indica en la parte superior de la figura, pero puesto que muchas de las curvas se traslapan, también se etiquetaron las curvas individuales en cada gráfica.

[0007] Figura 5: Unión de variantes de eNKG2D a ligandos tipo silvestre. Los ligandos tipo silvestre (todos en formato de fusión de Fc) se capturaron en biosensores Octet AHC, y cada NKG2D natural, NKG2D.Y152A, o eNKG2D5 (Y152A/Y199F) como una fusión de Fc se tituló de 300 nM a 0.41 nM. Las respuestas de unión máximas se cuantificaron por Octet. (Observar las diferentes ordenadas de cada gráfica).

[0008] Figura 6: ELISA de titulación de variantes de fagos individuales para confirmar la unión selectiva a Fc-NKG2D.AF y la unión reducida o eliminada a Fc-NKG2D.wt. Las mutaciones se detallan en la figura 22.

[0009] Figura 7: Datos de ELISA de cuatro MicAbodies de variante ULBP2 $\alpha 1$ - $\alpha 2$ no natural que se unen a NKG2D.wt, NKG2D.YA, y NKG2D.AF. Las variantes de Fc-NKG2D se utilizaron como agentes de captura. Los MicAbodies se titularon y detectaron con kappa anti-humano conjugado con HRP.

[0010] Figuras 8A-8B: ULBP2.C (SEQ ID NO: 111), ULBP2.R (SEQ ID NO: 113), ULBP2.AA (SEQ ID NO: 115), y ULBP2.AB (SEQ ID NO: 117) se examinaron para cambios en la inmunogenicidad de péptido-MHCI con relación al ULBP2 tipo silvestre (SEQ ID NO: 4) utilizando el servidor NetMHC4.0, que consulta contra los representantes de supertipo de HLA. Para la secuencia de entrada, la región variable (residuos 154-159 de acuerdo con la alineación en la figura 1B) para cada variante junto con los nueve residuos en dirección 5' y en dirección 3' (24 residuos en total) se introdujo y se examinaron las ventanas de péptidos

de 9-mero para la inmunogenicidad prevista. Los cuadros gris oscuro corresponden a péptidos que se prevé fuertemente que se unen a la cavidad de MHCI (definida como que tiene % de rango <0.5) y, por consiguiente, tienen una fuerte probabilidad de presentarse. Los cuadros gris claro corresponden a agentes de unión débiles previstos (% de rango <2). Ver el texto de ejemplo 5 para detalles adicionales.

[0011] Figuras 9A-9I: ULBP2.C (SEQ ID NO: 111), ULBP2.R (SEQ ID NO: 113), ULBP2.AA (SEQ ID NO: 115), y ULBP2.AB (SEQ ID NO: 117) se examinaron para cambios en la inmunogenicidad de péptido-MHC clase II con relación al ULBP2 tipo silvestre (SEQ ID NO: 4) utilizando el servidor NetMHCII 2.3, que consulta contra HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP. Para la secuencia de entrada, la región variable (residuos 154-159 de acuerdo con la alineación en la figura 1B) para cada variante junto con los 15 residuos en dirección 5' y en dirección 3' (36 residuos en total) se introdujo y se examinaron las ventanas de péptidos de 15-mero para la inmunogenicidad prevista. Los cuadros gris oscuro corresponden a péptidos que se prevé fuertemente que se unen a la cavidad de MHCII y, por consiguiente, es probable que se presenten y sean inmunogénicos. Los cuadros gris claro corresponden a agentes de unión débiles previstos.

[0012] Figuras 10A-10B: La unión medida por ELISA de rituximab-MicAbodies compuestos de ULBP2.wt (tipo silvestre), ULBP2.R80W (que tiene afinidad potenciada para NKG2D tipo silvestre), ULBP2.S3 (variante ortogonal seleccionada por NKG2D.YA), o ULBP2.R (variante ortogonal seleccionada por NKG2D.AF) a NKG2D.wt natural, a NKG2D.YA, y a NKG2D.AF. (figura 10A) curvas de ELISA. La reducción en la absorción de 458 nm para algunos ensayos a concentraciones más altas es un artefacto que se observa a menudo con acopladores de alta afinidad a concentraciones más altas debido a la precipitación del reactivo de desarrollo TMB-Ultra ELISA. (figura 10B) valores de EC50 (indicados en nM) como se determinan en GraphPad Prism con base en las curvas en (A). nd = no determinado debido a la falta de relación entre la concentración incrementada y la unión.

[0013] Figuras 11A-11C: Ensayos citolíticos in vitro con células efectoras de CD8 que ya sea se transdujeron o no se transdujeron con constructos de NKG2D.wt, NKG2D.YA, o NKG2D.AF CAR que constan

del dominio bisagra/transmembrana de CD8a y los dominios de señalización de Cd3zeta y 4-1BB intracelular. Las células diana se precargaron con calceína y se expusieron a las células efectoras en relaciones crecientes de efectora a diana (E:T). La calceína liberada se cuantificó después de cinco horas. (figura 11A) Lisis celular de células HeLa, (la figura 11B) lisis de células HeLa transfectadas para sobreexpresar ULBP1 de superficie, y (figura 11C) citolisis de células HeLa que expresan ULBP2.R no natural en su superficie. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de réplicas técnicas en el experimento.

[0014] Figuras 12A-12B: Citolisis dirigida a MicAbody de líneas de tumor por células T de CD8 de NKG2D-CAR. (figura 12A) Las células Ramos, que expresan CD20, la diana de rituximab, se precargaron con calceína y se expusieron a células de NKG2D.AF- o NKG2D.YA-CAR en una relación de E:T de 20:1 junto con concentraciones crecientes de ya sea rituximab-MicAbody ULBP2.S3 o ULBP2.R. El nivel de citolisis se cuantificó después de dos horas de coincubación. (figura 12B) La línea de tumor de ratón CT26 transfectada para expresar Her2 humana se utilizó como una diana de citolisis en paralelo con células Ramos. Las células T de CD8 de NKG2D.AF-CAR se pre-armaron con una concentración de saturación (5 nM) de rituximab-ULBP2.R, trastuzumab-ULBP2.R, o una mezcla equimolar de los dos MicAbodies. El MicAbody no unido se removió por lavado y se adicionaron células de CD8 a las células diana en dos relaciones de E:T diferentes. La citolisis se midió después de dos horas.

[0015] Figuras 13A-13D: Ilustraciones de formatos de MicAbody y MicAdaptor potenciales. (figura 13A) Diversas variantes de Fc de anticuerpo utilizadas en el desarrollo de reactivos de MicAbody y MicAdaptor e incluyen (a) Fc de IgG1 humana tipo silvestre, (b) dos mutaciones que vuelven al Fc deficiente en ADCC, y (c) mutaciones de dirección electrostática en cada Fc, Fc1 o Fc2, que permiten la generación de moléculas de Fc heterodimérico que también contienen las mutaciones de deficiencia en ADCC. (figura 13B) Ejemplo de cómo se pueden fusionar ligandos ortogonales al extremo C de la cadena (a) pesada o (b) ligera para generar reactivos de MicAbody. (figura 13C) Ejemplos de MicAdaptor con

fusión directa de ligando ortogonal sin componentes de anticuerpos. (figura 13D) Ilustración de la variedad de moléculas de MicAdaptor que se puede generar en el contexto de un Fc de IgG1 humana para estabilidad sérica potenciada y que pueden (a, b, c; denotadas como "Fc1/Fc2" en el texto y las leyendas) o pueden no (d, e) incluir las mutaciones de Fc heterodimérico dependiendo de la valencia de la molécula deseada para ya sea la carga heteróloga o el ligando ortogonal. Esto también puede incluir la utilización de la estructura de anticuerpo completa dependiendo de la carga, valencia, y funcionalidad deseadas (f, g) y pueden ser ya sea fusiones de cadena pesada o ligera.

[0016] Figura 14: Esquema de constructos de CAR, CAR imperceptibles, y otras variantes de CAR. SEQ ID NO para cada constructo como se indica.

[0017] Figuras 15A-15C: Administración selectiva de fusiones de citocinas a células T de CD8 que expresan NKG2D.YA-CAR. (figura 15A) células de CD8 que expresan ya sea el NKG2D.wt-CAR (SEQ ID NO: 151) o el NKG2D.YA-CAR, SEQ ID NO: 153) se expusieron a 30 o 300 IUe/mL de IL2 humana recombinante (rhIL2) o IL15 (rhIL15), o variaciones de fusiones directas de ligando ortogonal de IL2/IL15 mutante o fusiones en el contexto de un Fc heterodimérico (Fc1/Fc2). Después de tres días se cuantificó la proliferación por el reactivo de proliferación celular de WST. Los datos se muestran normalizados al control sin citocinas. (figura 15B) Células T humanas transducidas con un vector que codifica para NKG2D.YA-CAR se expusieron a varias moléculas de fusión de ligando-citocina durante siete días y se rastreó el porcentaje de células GFP+ CAR- en el cultivo con el paso del tiempo. (figura 15C) El ligando ortogonal potencia la administración de reactivos de IL21 e IL21 mutante a células de NKG2D.YA-CAR y promueve su expansión sobre las células no transducidas durante tres días de cultivo, como se determina por el ensayo de WST. IUe/mL de citocina o citocina-MicAdaptor indicadas entre paréntesis en la leyenda de abscisas. Ver figura 24 para MicAdaptor SEQ ID NO.

[0018] Figuras 16A-16C: Datos que exploran la suficiencia del ectodominio de NKG2D.YA solo en la promoción de administración de fusión de ligando ortogonal-citocina a las células. (figura 16A)

Ectodominio de NKG2D.YA solo (SEQ ID NO: 157) fue incapaz de dirigir la aniquilación de células Ramos con el rituximab-MicAbody ULBP2.S3 (SEQ ID NO: 98 y 129). (figura 16B) ensayo de proliferación de WST después de tres días de exposición a varios reactivos de citocina. (figura 16C) El ensayo de proliferación de WST demostró que el acoplamiento de NKG2D.YA-CAR con el ligando ortogonal pero en la ausencia de una citocina fusionada o un mutante de citocina fue insuficiente para impulsar la expansión celular. Ver figura 24 para MicAdaptor SEQ ID NO. Cantidades de IUE/mL de citocina y citocina-MicAdaptor indicadas entre paréntesis en leyenda de abscisas.

[0019] Figura 17A-17C: (figura 17A) Ensayo de proliferación de WST de varios mutantes de dominio coestimulante (SEQ ID NO: 161, 163, y 165) después de la incubación con la citocina designada o con el MicAdaptor de citocina durante tres días. (figura 17B) Los mismos mutantes de CAR de dominio costimulante examinados para su capacidad de lisar efectivamente células diana Ramos cargadas de calceína en la presencia de rituximab-MicAbody ULBP2.S3 (SEQ ID NO: 98 y 129). (figura 17C) La co-expresión del ectodominio de NKG2D.YA (NKG2D.YA-ecd) con un CD19scFv-CAR completo es suficiente para promover la proliferación, como se evalúa en el ensayo de WST después de tres días de incubación con reactivos de citocinas. Ver figura 24 para MicAdaptor SEQ ID NO.

[0020] Figura 18: Resumen de mutaciones de variante de Fc-eNKG2D candidatas, no naturales y propiedades de agregación de proteína determinadas por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

[0021] Figura 19: Porcentaje de saturación (Rmax) de variantes de eNKG2D normalizadas a la unión de NKG2D tipo silvestre con MICwed-MicAbody o a MIC25-MicAbody. El NKG2D de Fc tipo silvestre y cada receptor Fc-eNKG2D se capturaron en biosensores de AHC y entonces se expusieron a MicAbodies específicos para trastuzumab a 20 nM. Se controló la cinética de disociación y se calificaron los valores de Rmax de las fusiones de Fc-eNKG2D. Aquellas muestras no probadas (nt) eran debido a ya sea la agregación grave o la cantidad inadecuada de material expresado o recuperado después del fraccionamiento de SEC.

[0022] Figura 20: Los valores de EC50 (nM) para los ELISA de Fc-eNKG2D mostrados en la figura 3. nt = no probado; nb = sin unión o con una unión muy baja incluso a 300 nM, por lo que no se ha calculado el valor de EC50.

[0023] Figuras 21A-21B: Subconjunto de mutaciones combinatorias dentro de ULBP2 que dieron por resultado clones de fagos con unión selectiva a NKG2D.AF versus NKG2D.wt natural, como se verificó por ELISA de puntos. Los mutantes se calificaron por frecuencia de aparición entre los fagos seleccionados.

[0024] Figura 22: La especificidad de variantes de ULBP2 seleccionadas por NKG2D.AF en formato de rituximab-MicAbody retuvo su unión a NKG2D.AF por ELISA cuantitativo. Se muestran las modificaciones de aminoácidos específicas de cada variante ULBP2, así como las relaciones de su unión a la fusión de Fc-NKG2D.wt versus la fusión de Fc-NKG2D.AF. Las ubicaciones de residuos de aminoácidos de ULBP2 son aquellas de la figura 1B.

[0025] Figura 23: Las mutaciones seleccionadas en las ubicaciones de aminoácidos indicadas de ULBP2.R80W (figura 1B; SEQ ID NO: 108) que dieron por resultado clones de fagos específicos para Y152A.

[0026] Figura 24: MicAdaptor SEQ ID NO y método de purificación a partir de transfecciones transitorias.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0027] Los linfocitos citolíticos naturales (NK) y ciertas células T ($\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ CD8+) del sistema inmunitario tienen funciones importantes en seres humanos y otros mamíferos como defensa innata de primera línea contra células neoplásicas e infectadas (Cerwenka, A., y L.L. Lanier. 2001. NK cells, viruses and cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 1:41-49). Las células NK y algunas células T exhiben en su superficies NKG2D, un inmunorreceptor de superficie homodimérico, prominente responsable de reconocer una célula diana y activar la defensa innata contra la célula patológica (Lanier, LL, 1998. NK cell receptors. *Ann. Rev. Immunol.* 16: 359-393; Houchins JP et al. 1991. Análisis de secuencia de ADN de NKG2, una familia de clones de ADNc relacionados que codifican para proteínas de membrana integral tipo II en células NK

humanas. *J. Exp. Med.* 173: 1017-1020; Bauer, S et al., 1999. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285: 727-730). La molécula NKG2D humana posee un (ecto)dominio extracelular como lectina tipo C que se une a sus ocho ligandos cognados distintos, los ligandos más estudiados que son los MICA y MICB, idénticos u homólogos o idénticos en secuencia de 84%, análogos polimórficos de las glicoproteínas relacionadas con cadena (MIC) de Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) Clase I (Weis et al. 1998. The C-type lectin superfamily of the immune system. *Immunol. Rev.* 163: 19-34; Bahram et al. 1994. A second lineage of mammalian MHC class I genes. *PNAS* 91:6259-6263; Bahram et al. 1996a. Nucleotide sequence of the human MHC class I MICA gene. *Immunogenetics* 44: 80-81; Bahram and Spies TA. 1996. Nucleotide sequence of human MHC class I MICB cDNA. *Immunogenetics* 43: 230-233). La expresión no patológica de MICA y MICB se restringe a algunos epitelios intestinales, queratinocitos, células endoteliales y monocitos, pero la expresión en superficie aberrante de estas proteínas de MIC se presenta en respuesta a muchos tipos de estrés celular tal la proliferación, oxidación y choque térmico y marca la célula como patológica (Groh et al. 1996. Cell stress-regulated human MHC class I gene expressed in GI epithelium. *PNAS* 93: 12445-12450; Groh et al. 1998. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal $\gamma\delta$ T cells. *Science* 279: 1737-1740; Zwirner et al. 1999. Differential expression of MICA by endothelial cells, fibroblasts, keratinocytes and monocytes. *Human Immunol.* 60: 323-330). La expresión patológica de proteínas de también parece que se implica en algunas enfermedades autoinmunitarias (Ravetch, JV y Lanier LL. 2000. Immune Inhibitory Receptors. *Science* 290: 84-89; Burgess, SJ. 2008. *Immunol. Res.* 40: 18-34). La regulación diferencial de ligandos NKG2D, tal como los MICA y MICB polimórficos, es importante proporcionar al sistema inmunitario con un medio para identificar y responder a un amplio intervalo de señales de emergencia en tanto que aún se protegen las células sanas de ataques no deseados (Stephens HA, (2001) MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved? *Trends Immunol.* 22: 378-85; Spies, T. 2008. Regulation of NKG2D ligands: a purposeful but delicate affair. *Nature Immunol.* 9: 1013-1015).

[0028] La infección viral es un inductor común de expresión de proteína de MIC e identifica la célula infectada por virus para el ataque de células NK o T (Groh et al. 1998; Groh et al. 2001. Co-stimulation of CD8+ $\alpha\beta$ T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat. Immunol.* 2: 255-260; Cerwenka, A., and L.L. Lanier. 2001). De hecho, para evitar este ataque a su célula hospedadora, el citomegalovirus y otros virus han desarrollado mecanismos que impiden la expresión de proteínas de MIC en la superficie de la célula que infectan, a fin de escapar al direccionamiento por el sistema inmunitario innato (Lodoen, M., K. Ogasawara, J.A. Hamerman, H. Arase, J.P. Houchins, E.S. Mocarski, and L.L. Lanier. 2003. La protección de células NK mediada por NKG2D contra el citomegalovirus se deteriora por la modulación de gp40 de moléculas de RAE-1. *J. Exp. Med.* 197:1245-1253; Stern-Ginossar et al., (2007) Host immune system gene targeting by viral miRNA. *Science* 317: 376-381; Stern-Ginossar et al., (2008) Human microRNAs regulate stress-induced immune responses mediated by the receptor NKG2D. *Nature Immunology* 9: 1065-73; Slavuljica, I A Busche, M Babic , M Mitrovic, I Gašparovic, Đ Cekinovic, E Markova Car, EP Pugel, A Cikovic, VJ Lisnic, WJ Britt, U Koszinowski, M Messerle, A Krmpotic y S Jonjic. 2010. El citomegalovirus de ratón recombinante que expresa un ligando para el receptor NKG2D se atenúa y tiene propiedades de vacuna mejoradas. *J. Clin. Invest.* 120: 4532-4545).

[0029] A pesar de su estrés, muchas células malignas, tal como aquellas de cáncer de pulmón y cáncer de cerebro de glioblastoma, también evitan la expresión de proteínas de MIC y, como resultado, pueden ser en particular agresivas, puesto que también escapan al sistema inmunitario innato (Busche, A et al. 2006, NK cell mediated rejection of experimental human lung cancer by genetic over expression of MHC class I chain-related gene A. *Human Gene Therapy* 17: 135-146; Doubrovina, ES, MM Doubrovin, E Vider, RB Sisson, RJ O'Reilly, B Dupont, y YM Vyas, 2003. Evasion from NK Cell Immunity by MHC Class I Chain-Related Molecules Expressing Colon Adenocarcinoma (2003) *J. Immunology* 6891-99; Friese, M. et al. 2003. Terapia inmunogénica mediada por MICA/NKG2D de gliomas experimentales. *Cancer Research* 63: 8996-9006; Fuertes, MB, MV Girart, LL Molinero, CI Domaica, LE Rossi, MM Barrio, J Mordoh, GA

Rabinovich y NW Zwirner. (2008) Intracellular Retention of the NKG2D Ligand MHC Class I Chain-Related Gene A in Human Melanomas Confers Immune Privilege and Prevents NK Cell-Mediated Cytotoxicity. *J. Immunology*, 180: 4606 -4614).

[0030] La estructura de alta resolución de MICA humana unida a NKG2D se ha resuelto y demuestra que el dominio de $\alpha 3$ de MICA no tiene interacción directa con el NKG2D (Li et al. 2001. Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. *Nature Immunol.* 2: 443-451; código de acceso de Banco de Datos de Proteínas 1HYR). El dominio de $\alpha 3$ de MICA, como ese de MICB, se conecta al dominio de plataforma de $\alpha 1$ - $\alpha 2$ por un péptido de ligador corto y flexible, y él mismo se ubica naturalmente como "espaciador" entre la plataforma y la superficie de la célula que expresa MIC. Las estructuras tridimensionales de los dominios de $\alpha 3$ de MICA y MICB humanos son casi idénticas (distancia cuadrática media $<1 \text{ \AA}$ en 94 C- α) y funcionalmente intercambiables (Holmes et al. 2001. Structural Studies of Allelic Diversity of the MHC Class I Homolog MICB, a Stress-Inducible Ligand for the Activating Immunoreceptor NKG2D. *J Immunol.* 169: 1395-1400).

[0031] Las células T, células NK, y macrófagos se pueden modificar utilizando tecnologías de transferencia genética para expresar directamente y de manera estable en su superficie dominios de unión de un anticuerpo que confiere nuevas especificidades de antígeno (Saar Gill & Carl H. June. Going viral: Chimeric Antigen Receptor (CAR) T cell therapy for hematological malignancies. *Immunological Reviews* 2015. Vol. 263: 68–89; [Wolfgang Glienke](#), [Ruth Esser](#), [Christoph Priesner](#), Julia D. Suerth, Axel Schambach, [Winfried S. Wels](#), [Manuel Grez](#), [Stephan Kloess](#), [Lubomir Arseniev](#) y [Ulrike Koehl](#). 2015. Advantages and applications of CAR-expressing natural killer cells. *Front. Pharmacol.* doi: 10.3389/fphar.2015.00021). Las células T de CAR son aplicaciones de este enfoque que combina un dominio de reconocimiento de antígeno de un anticuerpo específico junto con un dominio intracelular fusionado de la cadena de CD3-zeta. La cadena de CD3-zeta es el transmisor principal de señales desde el ectodominio de receptores de células T endógenas (TCR) hasta el espacio intracelular. Los CAR contruidos

con la cadena de CD3-zeta y moléculas coestimulantes tal como CD27, CD28, ICOS, 4-1BB, u OX40 activan la activación de células T de CAR después de la unión al antígeno tomado como diana de una manera similar a un receptor de células T endógenas pero independiente del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).

[0032] Se han descrito ciertos dominios $\alpha 1$ - $\alpha 2$ no naturales de ligandos NKG2D modificados para unirse al receptor NKG2D humano natural con más altas afinidades que los dominios $\alpha 1$ - $\alpha 2$ naturales (Candice S. E. Lengyel, Lindsey J. Willis, Patrick Mann, David Baker, Tanja Kortemme, Roland K. Strong y Benjamin J. McFarland. Mutations Designed to Destabilize the Receptor-Bound Conformation Increase MICA-NKG2D Association Rate and Affinity. *Journal of Biological Chemistry* Vol. 282, no. 42, pp. 30658–30666, 2007; Samuel H. Henager, Melissa A. Hale, Nicholas J. Maurice, Erin C. Dunnington, Carter J. Swanson, Megan J. Peterson, Joseph J. Ban, David J. Culpepper, Luke D. Davies, Lisa K. Sanders, y Benjamin J. McFarland. Combining different design strategies for rational affinity maturation of the MICA-NKG2D interface. *Protein Science* 2012 VOL 21:1396—1402. En la presente se describe la unión de receptores NKG2D no naturales a la superficie de las células de mamífero en un formato que retiene la unión específica de ligandos NKG2D no naturales modificados con moléculas heterólogas unidas, pero los receptores no naturales evitan la activación directa o de cis o la señalización intracelular a la célula de mamífero incluso cuando la célula forma una sinapsis inmunológica con una célula u otra superficie dirigida (o tomada como diana) por la molécula heteróloga. Los receptores NKG2D no naturales mismos se han mutado en uno o dos sitios específicos, cada uno de los cuales da por resultado la unión comprometida o pérdida de unión a todos los dominios $\alpha 1$ - $\alpha 2$ naturales de ligandos NKG2D (David J. Culpepper, Michael K. Maddox, Andrew B. Caldwell y Benjamin J. McFarland. Systematic mutation and thermodynamic analysis of central tyrosine pairs in polyspecific NKG2D receptor interactions. *Mol Immunol.* 2011 Enero; 48(4): 516-523; solicitud de USPTO 14/562.534; solicitud provisional de USPTO 62/088,456)). La presente invención crea CAR que, cuando se unen a la superficie de una célula de

mamífero, proporcionan un receptor hecho imperceptible que puede servir como un receptor sustituto de alta afinidad para la unión a la superficie celular de átomos o moléculas heterólogas. Por consiguiente, mediante ligandos no naturales unidos específicos para el receptor NKG2D modificado no natural, las moléculas heterólogas que comprenden una citocina defectuosa, por ejemplo, se pueden administrar específicamente al receptor imperceptible en la superficie de la célula de mamífero, pero no a las células que carecen del receptor imperceptible cognado. Una vez unida a la célula que porta el receptor imperceptible, la molécula heteróloga defectuosa se puede unir a sus respectivas subunidades de receptor en la superficie celular a la cual se ha retenido la unión y, por consiguiente, señalar directamente la célula como si se estimulara por el ligando tipo silvestre.

[0033] Por supuesto, un CAR compuesto de un dominio coestimulante de CD3-zeta, de NKG2D no natural inerte tal como CD28, 4-1BB, ICOS u OX40 en una célula de mamífero es capaz de estimular y activar directamente la célula de CAR después de formar una sinapsis inmunológica. La activación de esta célula T de CAR de segunda o tercera generación depende de la función de su dominio de CD3-zeta y esa de al menos un dominio coestimulante, por ejemplo, 4-1BB o CD28. Sin embargo, este CAR puede, como un CAR imperceptible, servir como un receptor sustituto de alta afinidad para la unión de moléculas heterólogas unidas a ligando no naturales cognadas que tienen unión defectuosa a sus respectivos receptores naturales o subunidades de receptor. Esta unión de alta afinidad permite que la molécula heteróloga unida al ligando no natural transmita señales a la célula mediante sus respectivas otras subunidades de receptor para las cuales se ha retenido la unión.

[0034] De manera importante, cuando el dominio de CD3-zeta de un CAR competente para activación directa se inactiva de manera selectiva, puede seguir actuando como un CAR imperceptible y permitir que las moléculas heterólogas no naturales unidas al ligando natural cognado que tienen unión defectuosa a su respectivo receptor natural o subunidades de receptor transmitan señales a la célula mediante sus otras respectivas subunidades de receptor. Cuando el dominio coestimulante de de CAR tal

como 4-1BB se inactiva y se retiene un dominio de CD3-zeta activo, el CAR no puede servir como un receptor imperceptible. Es decir, aunque no se requiere CD3-zeta, se requiere un dominio coestimulante funcional para permitir que una molécula heteróloga tal como una citocina defectuosa unida a un ligando no natural cognado unido al receptor medie su respectiva señal a la célula de CAR.

[0035] La presente invención reveló la necesidad inesperada de un dominio coestimulante pero no CD3-zeta para permitir que la citocina heteróloga defectuosa unida a un ligando no natural cognado medie su respectiva señal a la célula de CAR. Además, la invención describe que el dominio coestimulante puede actuar en *cis* o *trans* al receptor imperceptible al cual se une el ligando cognado fusionado a la molécula defectuosa heteróloga defectuosa.

[0036] Cuando una molécula heteróloga tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se dirige a una molécula específica se une a un ligando NKG2D no natural cognado que a su vez se une al receptor imperceptible, la célula de mamífero que porta receptor imperceptible albergará la superficie a la que la molécula heteróloga dirigida dirige la misma. Incluso cuando se produce una "sinapsis" entre la célula que porta el receptor imperceptible y la superficie de célula diana, la primera no se activará por el receptor imperceptible.

[0037] Debido a que hay muchas copias de los receptores imperceptibles basados en NKG2D no natural de la presente invención en la superficie celular, la dirección y/o la activación selectiva por moléculas heterólogas se puede multiplexar o cambiar de manera secuencial durante los procesos de fabricación o protocolos de tratamiento.

[0038] Una célula que porta un CAR receptor imperceptible también puede expresar otro receptor o CAR ortogonal al CAR imperceptible y actuar independientemente del CAR imperceptible para activar de manera específica y directamente o señalar de otra manera esa misma célula cuando se estimula adecuadamente. El otro o "segundo" CAR ortogonal puede ser un CAR de Fv de cadena individual tradicional (scFv) o un segundo CAR ortogonal, basado en NKG2D modificado no natural con sus propios

ligandos de $\alpha 1$ - $\alpha 2$ no naturales cognados. (Referencia provisional de AF). La capacidad de crear células efectoras del sistema de inmunidad con más de un CAR ortogonal no natural, imperceptible o activo, y múltiples ligandos no naturales cognados con moléculas heterólogas o átomos unidos, expande en gran medida la utilidad, flexibilidad, y control de la Terapia celular adoptiva (ACT).

[0039] En el proceso de caracterizar el CAR imperceptible en una célula y su dependencia de un dominio coestimulante de acción *cis* o *trans*, tal como 4-1BB, se observó que en comparación a una célula T humana no modificada, una célula T humana que expresa un CAR imperceptible con un dominio coestimulante exhibió una respuesta significativamente potenciada a IL-2 natural o a un ligando no natural cognado fusionado a ya sea una IL-2 natural o mutante con baja afinidad a su subunidad de α de receptor. Esta observación tiene una utilidad importante en la expansión preferente *ex vivo* o *in vivo* de células que expresan un CAR compuesto de un dominio coestimulante con o sin un dominio de CD3-zeta.

[0040] Como se utiliza en la presente, una "proteína de MIC soluble", "MICA soluble" y "MICB soluble" se refieren a una proteína de MIC que contiene los dominios $\alpha 1$ - $\alpha 2$ con o sin el dominio de $\alpha 3$ de la proteína de MIC pero sin los dominios transmembrana o intracelular. Los ligandos NKG2D, ULBP1-6, no poseen naturalmente un dominio de $\alpha 3$ (Cerwenka A, Lanier LL. 2004. NKG2D ligands: unconventional MHC class I-like molecules exploited by viruses and cancer. *Tissue Antigens* 61 (5): 335–43. doi:10.1034/j.1399-0039.2003.00070.x. PMID: 12753652). Un "dominio $\alpha 1$ - $\alpha 2$ " de un ligando NKG2D se refiere al dominio de proteína del ligando que se une a un receptor NKG2D.

[0041] En algunas modalidades, los dominios $\alpha 1$ - $\alpha 2$ de las proteínas de ligando NKG2D no natural de la invención son al menos 80% idénticos u homólogos al dominio $\alpha 1$ - $\alpha 2$ nativo o natural de un ligando NKG2D (SEQ ID NO: 1-9 para MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4, ULBP5, ULBP6, y OMCP, respectivamente). En otras modalidades, el dominio $\alpha 1$ - $\alpha 2$ modificado es 85% idéntico a un dominio $\alpha 1$ - $\alpha 2$ nativo o natural de un ligando NKG2D. En aun otras modalidades, el dominio $\alpha 1$ - $\alpha 2$ modificado es 90%

idéntico a un dominio $\alpha 1$ - $\alpha 2$ nativo o natural de una proteína de ligando NKG2D natural y se une a NKG2D no natural.

[0042] Preferentemente, los dominios $\alpha 1$ - $\alpha 2$ modificado o no natural de las proteínas de MIC no natural de la invención son al menos 80% idénticos u homólogos a un dominio $\alpha 1$ - $\alpha 2$ nativo o natural de una de las 8 proteínas de ligando NKG2D humano (SEQ ID NO: 1-8) y se unen al ectodominio de NKG2D no natural. En algunas modalidades, el dominio $\alpha 1$ - $\alpha 2$ no natural es 85% idéntico a un dominio $\alpha 1$ - $\alpha 2$ nativo o natural de una proteína de ligando NKG2D y se une al NKG2D no natural. En otras modalidades, el dominio de plataforma de $\alpha 1$ - $\alpha 2$ no natural es 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a una plataforma de $\alpha 1$ - $\alpha 2$ nativo o natural de una proteína de dominio $\alpha 1$ - $\alpha 2$ natural humano y se une al NKG2D no natural.

[0043] En algunas modalidades, una etiqueta molecular heteróloga se puede fusionar al extremo N o extremo C de un dominio $\alpha 1$ - $\alpha 2$ no natural de una proteína de MIC soluble o a esa de un péptido o proteína heteróloga unida para ayudar en la purificación del ligando soluble. Las secuencias de etiqueta incluyen péptidos tal como una polihistidina, péptido de myc, una etiqueta de INDICADOR, etiqueta como estreptavidina, o una molécula pequeña tal como biotina. Estas etiquetas se pueden remover después del aislamiento de la molécula MIC por métodos conocidos por un experto en la técnica.

[0044] Se pueden realizar mutaciones específicas en dominios $\alpha 1$ - $\alpha 2$ de ligandos NKG2D para crear dominios $\alpha 1$ - $\alpha 2$ no naturales que se unen a receptores NKG2D no naturales, los mismos modificados genéticamente a fin de tener afinidad reducida por ligandos NKG2D naturales. Esto se puede hacer, por ejemplo, a través de modificación genética. Un receptor NKG2D no natural modificado de esta manera se puede utilizar para crear en la superficie de células NK, células T, macrófagos u otras células del sistema inmunitario un CAR basado en NKG2D que se puede unir a moléculas compuestas de los dominios $\alpha 1$ - $\alpha 2$ no naturales. Estos receptores NKG2D no naturales y sus ligandos NKG2D no naturales cognados proporcionarán ventajas de seguridad, eficacia, y fabricación importantes para tratar el cáncer e

infecciones virales en comparación a las células T de CAR y células NK de CAR actuales, como se describe a continuación. Cuando la señalización intracelular de receptores NKG2D no naturales en la superficie de células de mamífero se ha hecho imperceptibles como en la presente invención, estos CAR inventados pueden actuar como receptores sustitutos de alta afinidad para moléculas heterólogas de otra manera defectuosas tal como citocinas, quimiocinas, linfocinas, citotoxinas, y átomos fusionados o conjugados a los ligandos NKG2D ortogonales. Esto proporciona la administración de las moléculas heterólogas de manera directa y en específico a la célula que porta el receptor imperceptible sin que el receptor imperceptible *per se* active directamente su célula hospedadora. Además, las moléculas heterólogas que se unen a dianas específicas y, por consiguiente, células u otras superficies que portan estas dianas pueden proporcionar funciones de dirección específicas para la célula que porta el receptor imperceptible sin su activación o estimulación no deseada.

[0045] Las células T de CAR o NK de CAR compuestas de ectodominios de receptores NKG2D no naturales que no se unen o se unen de manera deficiente a ligandos NKG2D naturales no se someterán a la activación por ningún ligando natural y, por consiguiente, no serán toxigénicas como son las células que expresan un CAR con base en un receptor NKG2D natural. Además, los ectodominios de receptores NKG2D no naturales en células no estarán sujetos a regulación de manera regulada por ligandos NKG2D naturales en un formato soluble o en células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) ([Deng W](#), [Gowen BG](#), [Zhang L](#), [Wang L](#), [Lau S](#), [Iannello A](#), [Xu J](#), [Rovis TL](#), [Xiong N](#), [Raulet DH](#), 2015. Antitumor immunity. A shed NKG2D ligand that promotes natural killer cell activation and tumor rejection. *Science*. 2015 Abr 3;348(6230):136-9. doi: 10.1126/science.1258867. Epub 2015 Mar 5). Sin embargo, cuando estas células de CAR que portan ectodominios de receptores NKG2D no naturales se acoplan por moléculas biespecíficas con los dominios $\alpha 1$ - $\alpha 2$ no naturales cognados de la presente invención y su motivo de direccionamiento heterólogo que ha encontrado y unido su diana prevista, el CAR se activará y se expresarán las funciones efectoras de célula de CAR.

[0046] Debido a que las células T de CAR o NK de CAR compuestas de ectodominios del receptor NKG2D no naturales no se activan excepto en la presencia de una molécula biespecífica acoplada compuesta de un dominio $\alpha 1$ - $\alpha 2$ no natural cognado, su activación se puede controlar por las moléculas biespecíficas administradas, que como productos biofarmacéuticos exhibirán farmacocinética y farmacodinámica bien conocidas en el campo. En el caso de que se desarrolle un evento adverso, el facultativo puede simplemente modificar el régimen de dosificación de la molécula biespecífica administrada en lugar de tener que desplegar un mecanismo de suicidio inducido para destruir las células de CAR infundidas, como se hace actualmente ([Monica Casucci](#) y [Attilio Bondanza](#). Suicide Gene Therapy to Increase the Safety of Chimeric Antigen Receptor-Redirected T Lymphocytes. *J Cancer*. 2011; 2: 378–382). Además, estas moléculas biespecíficas con diferentes motivos de direccionamiento específicos se pueden administrar de manera simultánea o secuencialmente para ayudar a abordar la resistencia y escape de tumor como resultado de la pérdida de antígeno diana sin tener que crear, expandir e infundir múltiples células de CAR autólogas diferentes (Gill y June, 2015). Puesto que todas las construcciones de CAR pueden ser idénticas para todas las células de CAR y que la especificidad de direccionamiento determinada simplemente por el motivo de direccionamiento de la molécula biespecífica administrada de la presente invención, los procesos de fabricación se simplificarán y serán menos costosos.

[0047] Los ejemplos de proteínas o polipéptidos originales o receptores que son candidatos para la unión a dominios $\alpha 1$ - $\alpha 2$ no naturales de ligandos NKG2D incluyen, pero no se limitan a anticuerpos, proteínas compuestas de pliegues de Ig o dominios de Ig, que incluyen dominios de Fc modificados que reclutan moléculas naturales o fallan en reclutar o no se unen a moléculas naturales, globulinas, albúminas, fibronectinas y dominios de fibronectina, integrinas, proteínas fluorescentes, enzimas, proteínas de membrana externa, proteínas de receptor, receptores de células T, receptores de antígeno quimérico, antígenos virales, cápside de virus, ligandos virales para receptores de células, hormonas, citocinas y citocinas modificadas tal como interleucinas, nudos, péptidos cíclicos o polipéptidos, proteínas

de familia de histocompatibilidad mayor (MHC), proteínas de MIC, lectinas, y ligandos para lectinas. También es posible unir moléculas no de proteína tal como polisacáridos, dendrímeros, poliglicoles, peptidoglicanos, antibióticos, y policétidos a los dominios $\alpha 1$ - $\alpha 2$ modificados de ligandos NKG2D.

[0048] Por consiguiente, la presente invención expande la diversidad y practicidad de este enfoque inmunológico notable y muy prometedor para gestionar el cáncer con células T de CAR, células NK de CAR y células como macrófagos de CAR en tanto que se superan muchas de estas dificultades actuales reconocidas.

[0049] Como se utiliza en la presente, "péptido", "polipéptido" y "proteína" se utilizan indistintamente; y una "molécula heteróloga", "péptido heterólogo", "secuencia heteróloga" o "átomo heterólogo" es una molécula, péptido, secuencia de ácido nucleico o aminoácido, o átomo, respectivamente, que no se encuentra de manera natural o normalmente en conjunción física con la presente molécula. Como se utiliza en la presente, "no natural" y "modificado" se utilizan indistintamente. Como se utiliza en la presente, "natural", "nativo", y "tipo silvestre" se utilizan indistintamente y "NKG2D" y "receptor NKG2D" se utilizan indistintamente. El término "anticuerpo" en la presente se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada. "Fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo, preferentemente que comprende la región de unión a antígeno del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fv y Fv insertables; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena individual; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

[0050] El término "que comprende", que se utiliza indistintamente con "que incluye", "que contiene" o "caracterizado por", es un lenguaje inclusivo o abierto y no excluye, elementos adicionales no citados o pasos de método. La frase "que consta de" excluye cualquier elemento, paso, o ingrediente no

especificado en la reivindicación. La frase "que consta esencialmente de" limita el alcance de una reivindicación a los materiales o pasos especificados y aquellos que no afectan sustancialmente las características básicas y novedosas de la invención reivindicada. La presente descripción contempla modalidades de las composiciones y métodos de invención que corresponden al alcance de cada una de estas frases. Por lo tanto, una composición o método que comprende elementos o pasos citados contempla modalidades particulares en las que la composición o método consta esencialmente de o consta de aquellos elementos o pasos.

[0051] Todas las referencias citadas en la presente se incorporan por la presente como referencia en su totalidad, ya sea que se incorporen en específico anteriormente o no. Como se utiliza en la presente, los términos "uno", "una" y "cualquiera" se propone que incluyan tanto las formas singulares como plurales.

[0052] Habiendo descrito ahora completamente la invención, se apreciará por aquellos expertos en la técnica que la misma se puede realizar dentro de un amplio intervalo de parámetros, concentraciones y condiciones equivalentes sin desviarse del espíritu y alcance de la invención y sin experimentación indebida. En tanto que esta invención se ha descrito con relación a modalidades específicas de la misma, se entenderá que es capaz de modificaciones adicionales. Se propone que esta solicitud cubra cualquier variación, uso, o adaptación de la invención siguiendo, en general, los principios de la invención e incluyendo estas desviaciones de la presente descripción que como vienen dentro de la práctica conocida o habitual dentro de la técnica a la que pertenece la invención y se pueden aplicar a las características esenciales expuestas anteriormente en la presente.

EJEMPLOS

Ectodominio de receptor NKG2D modificado y dominios $\alpha 1$ - $\alpha 2$ modificados de ligandos NKG2D

[0053] Ejemplo 1. Modificación de tirosina 152 a alanina (Y152A) y tirosina 199 a fenilalanina (Y199F) del receptor NKG2D humano para crear un ecodominio de NKG2D inerte

[0054] Se ha demostrado por otros que las mutaciones en tirosina 152 o en tirosina 199 en NKG2D humano, el equivalente de las posiciones 73 y 120 del ectodominio de NKG2D (figura 1A, SEQ ID NO.:17) puede reducir en gran medida la unión a ligando natural, MICA (David J. Culpepper, Michael K. Maddox, Andrew B. Caldwell y Benjamin J. McFarland. Systematic mutation and thermodynamic analysis of central tyrosine pairs in polyspecific NKG2D receptor interactions. *Mol Immunol.* 2011 Enero; 48(4): 516–523). Se razonó que en tanto que la mutación de cualquier residuo de tirosina afectó en gran medida la capacidad de NKG2D para unirse a sus ligandos naturales, la mutación simultánea tanto en tirosina 152 (Y152) como en tirosina 199 (Y199) eliminaría prácticamente la capacidad del receptor para acoplarse con todos los ligandos nativos. Por consiguiente, se busca explorar sustituciones de Y152 e Y199 individuales y combinatorias y caracterizar las mismas con respecto a su comportamiento bioquímico con el objetivo de identificar variantes de mutación tanto simple como doble incapaces de acoplarse a cualquier ligando natural. Aquellas variantes que también expresaron y ensamblaron bien fueron de particular interés puesto que estos ligandos inertes significaron que se podrían producir más fácilmente para análisis.

[0055] Ectodominio de NKG2D natural (tipo silvestre) (NKG2D.wt, SEQ ID NO: 17) y ectodominios de variante de NKG2D no natural candidatos (SEQ ID NO: 18-35), también denominado "NKG2D modificado" o "eNKG2D" se clonaron como fusiones al extremo C de Fc de IgG1 humana (sin dominios de Fab), mediante un ligador de Ile-Glu-Gly-Arg reconocible por Xa de factor corto (SEQ ID NO: 38) y se denominan indistintamente Fc-NKG2D.wt o NKG2D.wt y Fc-eNKG2D o eNKG2D (SEQ ID NO: 40-58). Fragmentos de ADN gBlocks^{MR} (Integrated DNA Technologies, San Diego, CA), que corresponden a la secuencia de señal de MHCI (SEQ ID NO: 36 y 37), Fc de IgG1 humana con ligador (SEQ ID NO: 39), y variantes de ectodominio de NKG2D (SEQ ID NO: 59-77) se sintetizaron e insertaron en pD2610-V12 (ATUM, Newark, CA). Constructos de ADN que exploran sustituciones en Y152, Y199, o una combinación de mutaciones Y152/Y199 (figura 18) se expresaron transitoriamente en células Expi293^{MR} (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) y la proteína secretada se purificó por cromatografía de afinidad de proteína A

(no. de cat. 20334, Pierce Biotechnology, Rockford, IL). El material eluido se caracterizó por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) en columnas Akta Pur Superdex y el material correctamente ensamblado, y apropiado en tamaño se fraccionó y aisló de picos agregados antes de la inclusión en ensayos.

[0056] La caracterización de SEC de la fusión de NKG2D.Y199A-Fc purificada reveló una composición de material predominantemente agregado (figura 2). En comparación, tanto el material de fusión de Fc-NKG2D natural como de fusión de NKG2D.Y152A de Fc se distinguieron por un pico discreto, no agregado, que se diferenció fácilmente del agregado de migración de manera más rápida. El efecto de la mutación Y199A en la agregación también fue evidente en la variante de fusión de Fc-NKG2D mutante doble Y152A/Y199A, lo que indica que tuvo una influencia principal en el plegado incorrecto de proteínas (figura 2). Este aspecto de incluir Y199A con cualquier combinación de mutaciones Y152 en variantes de NKG2D, por consiguiente, presentó un desafío para la producción de material necesario para esfuerzos de modificación posterior y planteó una preocupación sobre el ensamblaje y la presentación en una superficie celular. Como consecuencia, se hizo un esfuerzo para explorar otras sustituciones en Y152 e Y199 que se podrían combinar para producir una molécula más robusta. Los candidatos mutantes Y152 e Y199 combinatorios de eNKG2D se examinaron como fusiones de Fc y se detallaron en (figura 18). Además, todos los candidatos de fusión de Fc-eNKG2D purificados y expresados se perfilaron por SEC y sus cromatogramas revelaron niveles variables de formación de agregados (figuras 2 y 3, figura 18). De las sustituciones de aminoácidos individuales exploradas en el residuo 152 alanina, serina, treonina, y valina, todas no afectaron el ensamblaje de la molécula de Fc-NKG2D, aunque la leucina de Y152 (Y152L) dio por resultado material altamente agregado. Similar a la alanina, ni el glutamato ni el aspartato se toleraron en la posición 199, aunque la fenilalanina sólo incrementó modestamente la formación de agregados. De las combinaciones de mutaciones que se exploraron, Y152A/Y199F, Y152S/Y199F, Y152T/Y199F, e Y152F/Y199F no impactaron negativamente la formación de dímeros deseada, en tanto que otras combinaciones dieron por resultado una agregación incrementada (figura 18, figuras 2 y 3).

[0057] Ejemplo 2: Generación de moléculas biespecíficas basadas en anticuerpos, "MicAbodies", con variantes de ligando NKG2D no natural

[0058] Para generar variantes de MicA no natural fusionadas a IgG1 humana, los polinucleótidos de ADN que codifican para los dominios de $\alpha 1$ - $\alpha 2$ de, por ejemplo, MICwed (SEQ ID NO: 279) y MIC25 (SEQ ID NO: 81), se amplificaron por PCR utilizando cebadores que también introdujeron el polinucleótido que codifica para ya sea un ligador de APTSSSGGGGS para fusión a cadena ligera kappa C-terminal (SEQ ID NO: 84) o para un ligador de GGGS para la fusión a la cadena pesada C-terminal de la IgG1 humana (SEQ ID NO: 82). Además, se introdujeron dos mutaciones en el dominio de CH2 de la cadena pesada, D265A/N297A (numeración de Kabat; figuras 13A y 13B), que reducen la unión a todos los receptores Fc γ R, eliminando de esta manera la función de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Shields et al., 2001 JBC, 276:6591-6604). El polinucleótido que codifica para el dominio de $\alpha 1$ - $\alpha 2$ de ULBP2 tipo silvestre (ULBP2.wt) sin su enlace GPI (SEQ ID NO: 12) se clonó y fusionó de manera similar a los polinucleótidos de ADN que codifican para los ligadores y la cadena pesada o cadena ligera de IgG1. Estos anticuerpos biespecíficos, denominados "MicAbody^{MR}" en singular, "MicAbodies" en plural, son bivalentes para el dominio de $\alpha 1$ - $\alpha 2$ fusionado. Los ejemplos de anticuerpos utilizados para generar MicAbodies con los propósitos de explorar la modificación de eNKG2D incluyen, pero no se limitan a, trastuzumab (SEQ ID NO: 94 y 96) y rituximab (SEQ ID NO: 98 y 100) y posteriormente denominado "trastuzumab-MicAbody" (por ejemplo, SEQ ID NO: 102 y 104) y "rituximab-MicAbody" (por ejemplo, SEQ ID NO: 106), respectivamente. Los constructos de fusión se insertaron individualmente en pD2610-V12 (ATUM, Newark, CA) mediante clonación de Gibson (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA). Para un anticuerpo determinado que reconoce un antígeno específico, el plásmido que codifica para la cadena pesada y el plásmido que codifica para la cadena ligera fusionada a ya sea el ligando NKG2D natural o no natural se co-transfectaron para la expresión transitoria en células Expi293^{MR} (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). De manera alternativa, el plásmido que codifica para la cadena pesada fusionada a ya sea

un ligando NKG2D natural o no natural y el plásmido para cadena ligera se co-transfectaron. Los anticuerpos biespecíficos secretados se purificaron por cromatografía de afinidad de proteína A (no. de cat. 20334, Pierce Biotechnology, Rockford, IL), el material eluido se caracterizó por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) en columnas Akta Pur Superdex y el fraccionamiento se realizó según fue necesario. Además, el análisis de SDS-PAGE se realizó en muestras purificadas para verificar los pesos moleculares esperados de la cadena pesada fusionada y las especies de cadena ligera fusionadas.

[0059] Ejemplo 3: Identificación de variantes de NK2GD modificadas incapaces de unirse a ya sea ligandos de unión a NKG2D naturales o a ligandos no naturales que tienen unión potenciada a NKG2D tipo silvestre

[0060] Las afinidades de unión de variantes de $\alpha 1$ - $\alpha 2$ a los dominios extracelulares de proteínas de NKG2D naturales (tipo silvestre) y eNKG2D no naturales se analizaron utilizando un método de ELISA basado en placas. Cada una de las fusiones de Fc-NKG2D naturales fraccionadas por SEC y Fc-eNKG2D no naturales se recubrieron durante la noche a 4 °C en concavidades separadas de placas de 96 concavidades Nunc Maxisorp (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) utilizando una concentración de recubrimiento de 1 µg/mL en solución salina amortiguada con fosfato (PBS). Las placas se lavaron tres veces en PBS/Tween-20 al 0.05% (PBS-T) a 20-22°C, y se bloquearon con albúmina de suero bovino al 0.5% en PBS (PBS-B) durante 2 horas a 20-22°C. Los MicAbodies se titularon contra las fusiones de Fc-NKG2D naturales o no naturales unidas a la placa durante 60 minutos a 20-22°C en PBS/albúmina de suero bovino al 0.5% (BSA)/Tween-20 al 0.05% (PBS-BT), se lavaron 3 veces con PBS-T a 20-22°C, y las proteínas biespecíficas unidas se detectaron utilizando un kappa anti-humano conjugado con HRP en PBS-BT (Abcam, Cambridge MA) y se desarrollaron con Solución de sustrato para ELISA 1-Step^{MR} Ultra TMB (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). La unión del rituximab-MicAbody ULBP2.wt (SEQ ID NO: 98 y 106) discriminaron entre las variantes de NKG2D tipo silvestre y eNKG2D con unión reducida a esta última, y las variantes de ligando, MICwed (SEQ ID NO: 96 y 102) y MIC25 (SEQ ID NO: 96 y 104), fueron más estrictos en la identificación de variantes de eNKG2D con unión de ligando abolida. Los comportamientos de unión para cada variante

de eNKG2D contra los tres ligandos biespecíficos revelaron las combinaciones de modificaciones de NKG2D que condujeron a la mayor reducción en la unión de ligandos tipo silvestre y variantes y permitieron la selección de variantes de NKG2D inertes principales.

[0061] También se realizó un análisis biofísico adicional de la unión de variante de eNKG2D a ligandos con interferometría de biocapa (BLI) utilizando el sistema Octet FortéBio (todo FortéBio LLC, Fremont, CA). Para estos experimentos, se compraron ligandos NKG2D humano MICA-Fc, MICB-Fc, ULBP1-Fc, ULBP2-Fc, ULBP3-Fc, y ULBP4-Fc de R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN). Los ligandos en el formato de MicAbody se capturaron en puntas de biosensor de captura de Fc anti-IgG humana (AHC). Después de que se establecieron las líneas base, las puntas se expusieron a una serie de titulación de proteínas de fusión de Fc-eNKG2D que varían de 300 nM a 0.41 nM y se monitoreó la cinética de asociación/disociación con todos los pasos realizados en PBS-BT. Posteriormente, las proteínas de fusión de Fc-eNKG2D se capturaron en puntas de AHC y se titularon MicAbodies para caracterizar la cinética de unión.

[0062] Para determinar la respuesta máxima como se define por la unión de NKG2D natural a ya sea MICwed o MIC25, se capturaron fusiones de Fc-NKG2D naturales en biosensores de AHC y se incubaron MicAbodies trastuzumab-MICwed 20 nM o trastuzumab-MIC25 20 nM durante dos minutos y entonces se observó la cinética de disociación durante 30 segundos. El análisis de unión en las mismas condiciones se realizó entonces con receptores de fusión de Fc-eNKG2D como el agente de captura, y el nivel de unión para cada eNKG2D se calificó como un porcentaje de la respuesta de unión máxima establecida por Fc-NKG2D.wt (Figura 19). Para MICwed, las respuestas de todas las variantes de Fc-eNKG2D mutantes individuales, excepto por Y199F, se disminuyeron a 50%. Y199F mantuvo 100% de respuesta de unión. Sin embargo, todas las variantes de Fc-eNKG2D mutante doble habían abolido completamente la unión a MICwed. Para MIC25, todas las variantes de Fc-eNKG2D mutantes individuales e Y152V/Y199F mantuvieron 100% de respuesta de unión con relación a la unión de Fc-NKG2D tipo

silvestre. Sin embargo, la unión se redujo a 50% con varias de las variantes Fc-eNKG2D mutantes doble que incluyen Y152A/Y199F, Y152S/Y199F, e Y152T/Y199F.

[0063] Se realizaron ensayos ELISA con fusiones de Fc-eNKG2D como agentes de captura con MicAbodies ULBP2.wt, MICwed, MIC25 titulados a partir de 300 nM (figura 4). Los valores de EC₅₀ se calcularon cuando fue posible utilizando GraphPad Prism (figura 20). NKG2D natural unido a ULBP2, MICwed, y MicAbodies basados en MIC25 con afinidades calculadas como valores de Kds de 1.4, 0.007, y 0.005 nM, respectivamente. En tanto que se disminuyó la afinidad por MicAbodies ULBP2 y MICwed con todos los candidatos de eNKG2D mutantes individuales, se retuvo la unión de MIC25 a los candidatos de eNKG2D. Sin embargo, todos los candidatos de eNKG2D mutante doble habían eliminado o reducido significativamente la unión a los tres ligandos, ULBP2, MICwed, y MIC25, en formatos de Micabody.

[0064] Las variantes de eNKG2D eNKG2D5 (Y152A/Y199F), eNKG2D7 (Y152S/Y199F), eNKG2D8 (Y152T/Y199F), y eNKG2D9 (Y152V/Y199F) habían reducido o abolido la unión a ULBP2, MICwed, y MicAbodies basados en MIC25 por tanto análisis de Octet como ELISA (figuras 19 y 20). Además, los eNKG2D 5, 7 y 8 tuvieron la menor cantidad de agregación, lo que sugiere un ensamblaje de proteína más robusto después de la expresión de 293T (figura 18). eNKG2D5 (SEQ ID NO: 48) se examinó más de cerca para la unión a ligandos tipo silvestre como MicAbodies capturados en puntas de AHC de Octet. Fc-NKG2D.Y152A mutante individual (SEQ ID NO: 41) tenían unión reducida a todos los ligandos naturales con relación a NKG2D (SEQ ID NO: 40) natural (figura 5). La curva de respuesta para la unión de eNKG2D5 (Y152A/Y199F) se redujo adicionalmente con relación a eNKG2D de Y152A. eNKG2D5 (Y152A/Y199F, en lo sucesivo conocido como “AF” o “NKG2D.AF”) se eligió como la variante de NKG2D principal para la cual modificar ligandos no naturales, ortogonales y selectivos cognados.

[0065] Ejemplo 4: Construcción de dominios α 1- α 2 no naturales ortogonales con unión selectiva al ecodominio de NKG2D.AF no natural

[0066] Se emplea la expresión en fagos para modificar dominios $\alpha 1$ - $\alpha 2$ no naturales ortogonales que exhiben la unión selectiva al receptor NKG2D.AF (SEQ ID NO: 48). Como un punto de inicio, el dominio $\alpha 1$ - $\alpha 2$ de ULBP2.R80W no natural (figura 1B; SEQ ID NO: 108) con alta afinidad por ectodominio de NKG2D natural tipo silvestre (NKG2D.wt) se seleccionó como el dominio original para mutagénesis adicional y examinación por expresión en fagos. Se generaron bibliotecas de ADN sintéticas para el dominio $\alpha 1$ - $\alpha 2$ de ULBP2.R80W (SEQ ID NO: 108) que adicionalmente tiene una mutación C8S para eliminar el potencial para enlaces disulfuro. Los codones de residuos de aminoácidos del ligando que en el estado unido se colocan en proximidad cercana a las posiciones Y152 e Y199 en el receptor NKG2D natural se reemplazaron con codones de NNK; las bibliotecas constaron de codones de NNK en las posiciones 154-159 (figura 1B; SEQ ID NO: 110). Las bibliotecas se clonaron como fusiones a la proteína de recubrimiento menor de pIII de fago M13, y las partículas de fago que muestran las variantes de dominio $\alpha 1$ - $\alpha 2$ mutagenizadas se produjeron en células *E.coli* de SS320 de acuerdo con metodologías estándar (Andris-Widhopf, J., Steinberger, P., Fuller, R., Rader, C. y Barbas, C. F., 3rd. (2011). Estas bibliotecas de expresión en fagos de $\alpha 1$ - $\alpha 2$ se clasificaron para una alta afinidad de unión al receptor NKG2D.AF no natural por la captura de manera selectiva de clones de fagos unidos a la proteína de Fc-NKG2D.AF biotinilado en la presencia de proteína competidora de Fc-NKG2D.wt natural no biotinilado. Los clones selectivos se enriquecieron por ciclación a través de múltiples rondas de selección competitiva con concentraciones crecientes del Fc-NKG2D natural no biotinilado.

[0067] Después de cuatro rondas de selección, los clones de fagos se arreglaron individualmente en formato de 96 concavidades, se realizaron ELISA de puntos para verificar la unión diferencial preferida a NKG2D.AF no natural unido a placa versus NKG2D.wt. Los fagos unidos se detectaron con anticuerpo monoclonal de proteína de recubrimiento de fago M13 biotinilado E1 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA), detección de estreptavidina-HRP (R&D Systems, Minneapolis, MN) y desarrollo de ELISA de 1-Step Ultra TMB (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). La señal de ELISA de puntos para cada clon se expresó

como una relación de NKG2D.AF de unión a fago a NKG2D.wt de unión a fago. Esos fagos con una relación mayor que o igual a 14 se secuenciaron para identificar las mutaciones específicas dentro de las regiones mutagenizadas de NNK. Figura 21 muestra los residuos de aminoácidos seleccionados para cada variante de fago de $\alpha 1$ - $\alpha 2$ que se unió selectivamente a NKG2D.AF. En casos donde se identificaron múltiples clones que representaban la misma secuencia, se graficó la relación de señales de ELISA, y se verificó la consistencia de clones de fagos por la agrupación de puntos de datos (datos no mostrados).

[0068] Treinta de las variantes identificadas en ELISA se expandieron en monocultivos individuales para generar microlotes de alto título de fago. Las concentraciones de fagos purificados se normalizaron a una $OD_{268} = 0.5$, entonces se sometieron a series de dilución de 1:3 contra Fc-NKG2D.AF unido a placa o Fc-NKG2D.wt con detección de fagos y desarrollo de ELISA realizado como se describe anteriormente. Las treinta variantes evaluadas de esta manera demostraron consistentemente unión selectiva a NKG2D.AF con poca a ninguna unión a NKG2D.wt (figura 6) incluso a las concentraciones más altas de fagos evaluados. Los fagos seleccionados también exhibieron un desplazamiento de dos o más registros de concentración de fago para lograr la unión semimáxima entre NKG2D.AF y NKG2D.wt.

[0069] Para confirmar que las variantes de dominio $\alpha 1$ - $\alpha 2$ selectivas de NKG2D.AF retuvieron propiedades de unión específicas en el contexto de fusiones de anticuerpos, 21 variantes (figura 22; por ejemplo, SEQ ID NO: 111-118) se clonaron como fusiones C-terminales con un ligador de APTSSSGGGGS a la cadena ligera del anticuerpo de rituximab (SEQ ID NO: 119-126). Los fusiones resultantes se clonaron en el vector de expresión de mamífero pD2610-V12 (ATUM, Newark, CA) mediante clonación de Gibson (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA) y se coexpresaron con la cadena pesada del anticuerpo original (SEQ ID NO: 99) como anticuerpos de IgG completos emparejados. Las expresiones transitorias se llevaron a cabo en células Expi293^{MR} (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) de acuerdo con el protocolo del fabricante, y se purificaron utilizando cromatografía de afinidad de proteína A estándar (no. de cat. 20334, Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Los ELISA que miden la unión de cada fusión de anticuerpo de $\alpha 1$ - $\alpha 2$

de ULBP2 de variante a Fc-NKG2D.AF no natural y a Fc-NKG2D.wt natural demostraron su afinidad de unión significativamente mayor hacia NKG2D.AF con relación a NKG2D.wt natural (figura 22). Colectivamente, estos datos demostraron la invención de dominios $\alpha 1$ - $\alpha 2$ ortogonales no naturales que poseían unión de alta afinidad al receptor NKG2D.AF no natural y redujeron significativamente la afinidad de unión a receptor NKG2D natural. Además, las fusiones de estos dominios $\alpha 1$ - $\alpha 2$ ortogonales a polipéptidos de anticuerpo retuvieron sus propiedades de unión selectiva y se utilizaron, por ejemplo, en el contexto de células T de receptor de antígeno quimérico (CAR), para redirigir receptores NKG2D.AF no naturales hacia antígenos específicos.

[0070] Ejemplo 5: Identificación de ligandos NKG2D no naturales que pueden discriminar entre variantes de receptor NKG2D no natural por la unión de manera selectiva de uno o el otro

[0071] La expresión en fagos para modificar dominios $\alpha 1$ - $\alpha 2$ no naturales ortogonales con unión selectiva a NKG2D.Y152A (en lo sucesivo conocido como NKG2D.YA, el receptor se realizó con dominio $\alpha 1$ - $\alpha 2$ de ULBP2.R80W no natural (SEQ ID NO: 108) como el punto de inicio como se describe anteriormente. Las bibliotecas de expresión en fagos de $\alpha 1$ - $\alpha 2$ se cribaron para la alta afinidad de unión al receptor de Fc-NKG2D.YA no natural al capturar selectivamente clones de fagos unidos a proteína de Fc-NKG2D.YA biotinilado (SEQ ID NO: 41) en la presencia de proteína de competidor de Fc-NKG2D.wt natural no biotinilado (SEQ ID NO: 40). El trabajo de validación de clones de fago adicional dio por resultado la identificación de variantes con unión preferencial a Fc-NKG2D.YA versus Fc-NKG2D.wt (figura 23). ULBP2.S3 (SEQ ID NO: 127), por ejemplo, demostraron consistentemente la unión selectiva por análisis de ELISA y Octet (tanto en formato fusionado de anticuerpo etiquetado con His monomérico como biespecífico) a NKG2D.YA no natural con relación a NKG2D.wt natural. Esto representó una forma distinta de la invención de dominios $\alpha 1$ - $\alpha 2$ ortogonales no naturales que poseen unión de alta afinidad a receptores NKG2D no naturales (en este caso NKG2D.YA en oposición a NKG2D.AF como en el ejemplo 4). Además, las fusiones de dominios $\alpha 1$ - $\alpha 2$ ortogonales a polipéptidos de anticuerpo retuvieron sus

propiedades de unión selectiva y se utilizaron para redirigir selectivamente receptores NKG2D no naturales hacia moléculas específicas determinadas por péptidos heterólogos fusionados tal como anticuerpos.

[0072] A fin de determinar si un dominio $\alpha 1$ - $\alpha 2$ no natural con unión selectiva a NKG2D.YA (ULBP2.S3, SEQ ID NO: 127) y los dominios $\alpha 1$ - $\alpha 2$ no naturales con unión selectiva a NKG2D.AF podrían discriminar entre estas dos variantes de receptor no natural, se realizaron ELISA de titulación. Las 21 variantes de $\alpha 1$ - $\alpha 2$ seleccionadas que se unieron a NKG2D.AF se compararon directamente para la unión a NKG2D.AF versus NKG2D.YA. De estos, cuatro demostraron las propiedades de incapacidad para unirse a NKG2D.wt, afinidad fuerte por NKG2D.AF, y redujeron en gran medida (15-20 veces) o eliminaron la unión a NKG2D.YA con relación a NKG2D.AF (figura 7). Estas cuatro variantes de ULBP2 de $\alpha 1$ - $\alpha 2$ no natural: ULBP2.C, ULBP2.R, ULBP2.AA, y ULBP2.AB (SEQ ID NO: 111, 113, 115 y 117), también se examinaron para alteraciones en el perfil de inmunogenicidad previsto con relación a la secuencia de péptidos de ULBP2 tipo silvestre (SEQ ID NO: 4) utilizando el servidor NetMHC4.0 (para la unión de péptido-MHC clase I que consulta contra todos los representantes de supertipo de HLA con análisis de péptido de 9-mero; <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/>) y el servidor NetMHCII 2.3 (para la unión de péptido-MHC clase II que consulta contra haplotipos HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP con análisis de péptido de 15-mero; <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCII/>), ambos algoritmos que se desarrollaron por la Universidad Técnica de Dinamarca (<http://www.bioinformatics.dtu.dk/>; Andreatta M y Nielsen M, Gapped sequence alignment using artificial neural networks: application to the MHC class I system, 2016 *Bioinformatics*, 32:511, PMID: 26515819; Jensen KK, Andreatta M, Marcatili P, Buus S, Greenbaum JA, Yan Z, Sette A, Peters B, and Nielsen M, Improved methods for predicting peptide binding affinity to MHC class I molecules, 2018 *Immunology*, PMID: 29315598). Las mutaciones incorporadas en ULBP2.C, ULBP2.R, y ULBP2.AB no incrementaron la inmunogenicidad prevista, en tanto que esa de ULBP2.AA se incrementó ligeramente para unos pocos haplotipos (figuras 8 y 9). Como consecuencia de la especificidad de ULBP2.R

para NKG2D.AF y su falta de inmunogenicidad predecible, ULBP2.R se seleccionó para análisis ELISA adicional para comparar directamente su comportamiento de unión con ULBP2.S3 (el ligando ortogonal no natural seleccionado por NKG2D.YA), ULBP2.R80W (ligando no natural con afinidad potenciada por NKG2D tipo silvestre) y ULBP2 tipo silvestre (ULBP2.wt). Unión de los cuatro reactivos de rituximab-MicAbody (SEQ ID NO: 98 y 121, 98 y 129, 131 y 100, y 98 y 106 como cadena pesada y cadena ligera para ULBP2.R, ULBP2.S3, ULBP2.R80W y ULBP2.wt, respectivamente) se evaluó contra NKG2D tipo silvestre (NKG2D.wt) y las dos variantes inertes no naturales NKG2D.YA y NKG2D.AF (figura 10). Los datos demostraron que la variante ULBP2.S3 seleccionada por NKG2D.YA como un MicAbody se unió con alta afinidad a NKG2D.YA pero no se acopló a NKG2D.AF o NKG2D natural. Además, la variante ULBP2.R seleccionada por NKG2D.AF en formato de MicAbody se unió con alta afinidad a NKG2D.AF pero no se acopló a NKG2D.YA o NKG2D natural. Estos resultados demostraron el enorme potencial de explorar el eje de ligando NKG2D-MIC y para desarrollar pares únicos de receptores NKG2D no naturales novedosos y selectivos y sus respectivos compañeros de unión a ligando de MIC no naturales cognados.

[0073] Ejemplo 6: La actividad de direccionamiento y aniquilación de células T de CAR que expresan el ecodominio de NKG2D.AF no natural se controla por dominios $\alpha 1$ - $\alpha 2$ ortogonales fusionados a polipéptidos de direccionamiento heterólogos

[0074] Los medios para controlar selectivamente las terapias de células T de CAR se buscan altamente para mitigar la toxicidad y mejorar la eficacia contra los tumores (Gill y June, op cit). Se han hecho intentos anteriores para desarrollar CAR utilizando el ectodominio de CD16 que entonces se puede acoplar a través del dominio de Fc de anticuerpos monoclonales terapéuticos, lo que permite el control basado en anticuerpos de direccionamiento de T de CAR (Chang et al., op cit). Sin embargo, las células T de CAR basadas en CD16 pueden reconocer casi todas las moléculas de anticuerpos endógenos en sangre y tejidos, y los anticuerpos terapéuticos utilizados para controlar estas células encontrarán competencia de receptores de CD16 endógenos en células NK, PMN, monocitos y macrófagos. Ambas de estas

características contribuyen con problemas de toxicidad fuera de tumor y farmacocinética deficiente, respectivamente.

[0075] Los ligandos NKG2D natural están presentes en ciertos tejidos sanos y muchos tejidos estresados, lo que crea un riesgo extremo de toxicidad utilizando enfoques actuales de CAR de NKG2D (VanSeggelen et al. 2015). El receptor NKG2D no natural de Y152A unido específicamente a ligandos NKG2D de dominio $\alpha 1$ - $\alpha 2$ no natural que constituye un ejemplo de un medio por el cual la actividad de un CAR de NKG2D no natural se podría controlar selectivamente utilizando proteínas biespecíficas compuestas del dominio $\alpha 1$ - $\alpha 2$ no natural inventado de ligandos NKG2D.

[0076] Se modificaron las células T de CAR con un receptor compuesto de un ectodominio de Y152A/Y199F modificado ("AF") de NKG2D que carece de unión a todos los ligandos NKG2D naturales o dominios $\alpha 1$ - $\alpha 2$ no naturales descritos anteriormente ortogonales y cognados a NKG2D modificado con Y152A (NKG2D.YA). Los dominios $\alpha 1$ - $\alpha 2$ no naturales cognados inventados se unieron con alta afinidad al ectodominio de NKG2D.AF no natural y evitaron la unión a los ectodominios de NKG2D naturales y al ectodominio de NKG2D.YA. Por consiguiente, los dominios $\alpha 1$ - $\alpha 2$ modificados que exhibieron fuerte selectividad para el ectodominio de NKG2D.AF no natural sobre NKG2D natural y NKG2D.YA no natural representan un sistema ideal para el control selectivo de receptores de CAR de NKG2D no natural, o cualquier receptor o proteína fusionada a ectodominios de NKG2D no natural que se puede acoplar selectivamente por los dominios $\alpha 1$ - $\alpha 2$ no natural de la presente invención. La presente invención permite además que células individuales expresen dos CAR distintos, uno compuesto de NKG2D.YA y el otro de NKG2D.AF, cada señalización con dominios intracelulares claramente diferentes. Estos CAR distintos poseerían controles independientes y duales de las actividades de célula por exposición extracelular al respectivo MicAbody ortogonal cognado u otro polipéptido de fusión no de anticuerpo.

[0077] Para demostrar el control selectivo de células T de CAR construidas con un receptor quimérico que despliega el ectodominio de NKG2D.AF no natural, se construyeron CAR con el NKG2D.wt

natural (SEQ ID NO: 135), NKG2D.YA no natural (SEQ ID NO: 137), o el NKG2D.AF no natural (SEQ ID NO: 139) ectodominios con base en trabajos anteriores que utilizan constructos de CAR de 4-1BB/CD3-zeta (patente Campana 8,399,645) que fusionan los respectivos ectodominios de NKG2D con la región bisagra de CD8 de CAR (SEQ ID NO: 151, 153, 155) . Estos constructos (SEQ ID NO: 152, 154, 156) se clonaron en un vector lentiviral y se expresaron en células T positivas para CD8 humana primaria utilizando transducción lentiviral. Las células HeLa tienen niveles incrementados de manera regulada constitutivamente de ligandos de MIC en su superficie que incluyen MICA, MICB, ULBP3, y ULBP2/5/6 (el anticuerpo utilizado para verificar esto no puede distinguir entre estos tres ULBP; anticuerpo de ULBP-2/5/6 humano, R&D Systems, Minneapolis, MN). Las células HeLa se transfectaron para sobreexpresar ya sea ULBP1 natural o la variante ULBP2.R seleccionada por NKG2D.AF en su superficie, y estas células se utilizaron como una diana para ensayos de aniquilación *in vitro*. Las células diana de HeLa se precargaron con calceína y se expusieron a células de CD8 de NKG2D.wt-CAR, NKG2D.YA-CAR, o NKG2D.AF-CAR en relaciones de efectora a diana crecientes (E:T) durante cinco horas, después de lo cual la cantidad de calceína liberada en el sobrenadante se cuantificó y normalizó a la calceína total liberada después del tratamiento con detergente (figura 11). Debido a los niveles elevados de ligandos de MIC expresados naturalmente en la superficie de células HeLa, las células de CD8 que expresan NKG2D natural (NKG2D.wt) conforme el CAR se acoplaba a las células HeLa mediante este ligando natural sobreexpresado y citolisis efectuada. Sin embargo, las células de CD8 transducidas tanto por NKG2D.YA como por NKG2D.AF-CAR demostraron muy poca lisis de células HeLa naturales incluso en relaciones de E:T altas, un nivel de actividad que está a la par de las células T de CD8 no transducidas. Cuando ULBP1 se sobreexpresa en la superficie de células HeLa, sólo las células T de CD8 de NKG2D.wt-CAR lisaron significativamente las mismas. Hay alguna aniquilación adicional en la relación de E:T alta con células NKG2D.YA-CAR, pero esto es inexistente con células de NKG2D.AF-CAR que muestran que la doble mutación Y152A/Y199F vuelve a NKG2D aún más inerte que la mutación Y152A individual. En células HeLa que sobreexpresan el ULBP2.R

no natural selectivo de NKG2D.AF, las células de NKG2D.wt-CAR dirigen la lisis (debido al reconocimiento de ligandos de MIC endógenos) en tanto que las células de NKG2D.AF-CAR dirigen niveles significativos de lisis consistentes con el acoplamiento del receptor y su ligando selectivo.

[0078] A fin de demostrar que la lisis de ya sea células de NKG2D.YA o NKG2D.AF-CAR sólo se pudo dirigir por el MicAbody de direccionamiento de cognado apropiado, se utilizaron células Ramos como una diana para citolisis en combinación con MicAbodies basados en rituximab vinculados a ya sea ligandos ortogonales de ULBP2.S3 o ULBP2.R no naturales. Como se demuestra en la figura 12A, el rituximab-MicAbody ULBP2.S3 podría dirigir la actividad de aniquilación celular de células de CD8 de NKG2D.YA-CAR pero no células de NKG2D.AF-CAR, en tanto que el rituximab-MicAbody ULBP2.R podría dirigir la actividad de células de NKG2D.AF-CAR pero no células de NKG2D.YA-CAR. Esto demuestra además la selectividad de las dos variantes de ULBP2 no naturales para sus variantes de NKG2D no natural cognado para las cuales se modificaron como compañeros preferidos. A fin de demostrar la especificidad de la porción de anticuerpo del MicAbody, se realizaron ensayos de aniquilación *in vitro* con células T de CD8 de NKG2D.AF-CAR que se pre-armaron por incubación con ya sea rituximab-ULBP2.R, trastuzumab-ULBP2.R (SEQ ID NO: 95 y 133, cadena pesada y ligera, respectivamente), o una combinación equimolar de los dos a una concentración total de saturación de MicAbody. Después de que MicAbody no unido se removió por lavado, las células de CD8 se aplicaron a ya sea células Ramos (que expresan CD20, la diana de rituximab) o a CT26-Her2 (una línea celular de ratón transfectada para expresar Her2 humana) que se ha precargado con calceína. Después de una incubación de dos horas a dos relaciones de E:T diferentes, se cuantificó la cantidad de calceína liberada. Como se muestra en la figura 12B, cuando las células se prearmaron con rituximab-MicAbody, sólo se lisaron células Ramos en tanto que trastuzumab-MicAbody dirigió la actividad citolítica sólo contra células CT26-Her2. Sin embargo, cuando las células de CD8 de NKG2D.AF-CAR se prearmaron simultáneamente con MicAbodies tanto rituximab- como trastuzumab-ULBP2.R, ambas líneas de células diana se lisaron lo que demuestra que estas células de CAR, en virtud de

la asociación selectiva y privilegiada que se ha modificado entre receptor y ligando, se multiplexaron fácilmente y, por consiguiente, se dirigieron para acoplar diferentes dianas de tumor simultáneamente.

[0079] Ejemplo 7: dominios $\alpha 1$ - $\alpha 2$ ortogonales como un medio para administrar selectivamente citocinas a células T que expresan NKG2D no naturales modificadas

[0080] MicAbodies biespecíficos (figura 13B) que utilizan los dominios de Fv que se dirigen a antígeno de anticuerpos y la interacción privilegiada entre los dominios de $\alpha 1$ - $\alpha 2$ ortogonales y NKG2D.YA no natural modificado o NKG2D.AF (SEQ ID NO: 137 y 139, respectivamente) pueden dirigir efectivamente las capacidades citolíticas de células T que portan NKG2D.YA- o NKG2D.AF-CAR (SEQ ID NO: 153 y 155, respectivamente) para eliminar células diana que expresan antígeno. Además, la interacción altamente selectiva entre ligandos ortogonales cognados y NKG2D no natural, modificado (también denominado "modificado") (eNKG2D) se puede utilizar para administrar selectivamente moléculas a células que portan ectodominio eNKG2D (eNKG2D-ecd). Si el átomo o molécula heteróloga (carga útil/carga) a la que se fusiona el ligando ortogonal es inherentemente bioactivo con funciones potencialmente indeseables cuando se administra a una célula que expresa no de eNKG2D, se pueden explorar mutaciones en la molécula bioactiva que reducen las interacciones con dianas o receptores nativos. Cuando se fusiona con un ligando ortogonal, la molécula final sería, por consiguiente, efectivamente inerte para todas las funciones biológicas, excepto cuando están presentes células que portan receptor eNKG2D cognado. Sólo cuando se presenta la interacción de alta afinidad entre el ligando ortogonal y el receptor eNKG2D existe interacción entre el mutante de afinidad reducida de la molécula bioactiva y su diana o receptor natural y se permite la función residual de la molécula bioactiva. Todas las fusiones de ligando ortogonal a entidades con el propósito de dirigir las mismas a células que expresan eNKG2D se conocen colectivamente como MicAdaptor y, en principio, pueden tomar la forma de fusiones de proteínas directas como un polipéptido individual entre la carga útil y el ligando ortogonal en ya sea el extremo N o C con o sin un ligador o etiqueta (por ejemplo, etiqueta His) para ensayos o purificación (figura 13C).

Adicionalmente, si se desea una estabilidad sérica potenciada, el dominio de Fc de anticuerpo se puede incluir ya sea como sólo los dominios de CH2-CH3 o en el formato de un anticuerpo completo, dependiendo de la cantidad deseada de cargas útiles únicas, la valencia de ya sea el ligando ortogonal o carga heteróloga, y la arquitectura general determinada experimentalmente que promueve la mayor funcionalidad de todos los componentes (figura 13D).

[0081] Para determinar si las citocinas se pueden administrar selectivamente a células que expresan NKG2D.YA-CAR (SEQ ID NO: 153), el ligando ortogonal cognado ULBP2.S3 (U2S3, SEQ ID NO: 127) se expresó fusionado al extremo N de Fc1 que se ha alterado a dos residuos para expresar residuos de ácido aspártico cargados negativamente en la interfaz de homodimerización de Fc (SEQ ID NO: 189). Una forma mutante de IL2 humana (mutIL2), que contiene dos mutaciones R38A/F42K que redujeron significativamente la afinidad de la citocina al complejo de IL2R-alfa (K. M. Heaton, G. Ju y E. A. Grimm, Human Interleukin 2 Analogues That Preferentially Bind the Intermediate-Affinity Interleukin 2 Receptor Lead to Reduced Secondary Cytokine Secretion: Implications for the Use of These Interleukin 2 Analogues in Cancer Immunotherapy, 1993 Cancer Res 53:2597, PMID: 8495422; K. Sauvé et al., Localization in Human Interleukin 2 of the Binding Site to the Alpha Chain (P55) of the Interleukin 2 Receptor, 1991 PNAS 88:4636, PMID: 2052547), se fusionó al extremo C de Fc2 que se ha alterado a dos residuos para expresar residuos de lisina cargados positivamente en la interfaz de homodimerización de Fc (SEQ ID NO: 183). Ambos se clonaron independientemente en el vector de expresión de mamífero pD2610-V12 (ATUM, Newark, CA), se co-transfectaron en células Expi293^{MR} (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) de acuerdo con el protocolo del fabricante, y se purificaron utilizando cromatografía de afinidad de proteína A estándar (no. de cat. 20334, Pierce Biotechnology, Rockford, IL). El material purificado se fraccionó por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) en columnas Akta Pur Superdex. Los residuos cargados negativamente en Fc1 y las cargas positivas en Fc2 proporcionaron un efecto de dirección electrostática (Kannan Gunasekaran et al., Enhancing Antibody Fc Heterodimer Formation through Electrostatic Steering

Effects: Applications to Bispecific Molecules and Monovalent IgG, 2010 J Biol Chem 285:19637, PMID: 20400508) que promovió el ensamblaje heterodimérico de una molécula que era monovalente para el ligando U2S3 ortogonal y mutIL2 (figura 13Da). Además, se exploraron MicAdaptor compuestos de otras combinaciones de ligandos ortogonales ULBP2 con fusiones de citocinas, ya sea como fusiones heterodiméricas de Fc1/Fc2 o como un polipéptido individual donde ambos componentes se fusionaron directamente, y sus ADN se clonaron, coexpresaron, y purificaron de manera similar como se detalla en la figura 24 y como se describe anteriormente. IL2 humana recombinante (rhIL2, Peprotech) e IL15 humana recombinante (rhIL15, Peprotech) se incluyeron como controles en los ensayos según fue necesario.

[0082] Se transducieron células T humanas de CD8 para expresar ya sea el constructo de NKG2D.wt-CAR (SEQ ID NO: 151) o el constructo de NKG2D.YA-CAR (SEQ ID NO: 153) y se expuso a 30 IUe/mL de citocina de control o varios MicAdaptor durante tres días y el nivel de proliferación celular se cuantificó con el reactivo de proliferación celular de WST-1 (Millipore Sigma). El rhIL2 de control promovió la proliferación de ambas células que expresan CAR en tanto que la mutIL2 sola no lo hizo como se esperaría de la capacidad reducida de acoplarse a IL2R-alfa y, por consiguiente, redujo la capacidad de señalizarse a través de IL2R-beta/gamma-C (figura 15A). Cuando el MicAdaptor se componía del ligando U2R80W no selectivo (U2R80W-mutIL2, SEQ ID NO: 177), que se acopló con alta afinidad a receptores NKG2D.YA tanto modificados como tipo silvestre, las células que expresaban cualquiera de los CAR respondieron por proliferación. Sin embargo, cuando la mutIL2 se fusionó a un ligando ortogonal, tal como ULBP2.S2 (SEQ ID NO: 179) que acopla selectivamente sólo NKG2D.YA, el MicAdaptor, U2S2-mutIL2) que sólo se acopla con NKG2D.YA, sólo las células de NKG2D.YA-CAR respondieron por proliferación. Se obtuvieron resultados similares cuando la citocina fusionada a U2S2 fue una versión mutante de IL15 con una mutación V49D (Bernard, J. et al., Identification of an Interleukin-15 α Receptor-binding Site on Human Interleukin-15, 2004 Journal of Biological Chemistry, 279:24313, PMID: 15039446) que redujo el

acoplamiento con IL15R-alfa (figura 15A). Cuando las células T de NKG2D.YA-CAR se co-cultivaron durante siete días con estos reactivos, el % GFP+ (indicativo del porcentaje de células que expresan CAR presentes en comparación a las células negativas para GFP no transducidas) incrementó, pero sólo cuando el ligando ULBP2.S2 ortogonal (U2S2-mutIL2 o U2S2-Fc1/Fc2-mutIL2, figura 24 para SEQ ID NO) estaba presente y no con la variante de U2R80W no selectiva (que se unió al receptor NKG2D natural tipo silvestre constitutivamente presente en células de CD8 humanas) (figura 15B). IL21 también se exploró como ya sea una fusión tipo silvestre (IL21.wt), con mutaciones individuales que afectaron la unión de IL21R-alfa (D18A o E109R), o una versión con ambas mutaciones incluidas (D18A/E109R) (Kang, L. et al., Rational Design of Interleukin-21 Antagonist through Selective Elimination of the γ C Binding Epitope, 2010 Journal of Biological Chemistry, 285:12223, PMID: 20167599). En una comparación entre células de CD8 no transducidas o células que expresan NKG2D.YA-CAR, sólo células que portan NKG2D.YA respondieron a todas las versiones de fusiones de IL21 (ver figura 24 para SEQ ID NO), incluyendo a la fusión de IL21.wt (figura 15C). De manera interesante, en tanto que las células de NKG2D.YA-CAR y no transducidas se expandieron en respuesta a rhIL2 en comparación al control sin citocinas, la cantidad de proliferación fue más alta con las células de NKG2D.YA-CAR. La respuesta proliferativa de células que expresan NKG2D.YA-CAR fue independiente de una unión o acoplamiento generalizado del dominio de NKG2D.YA puesto que un U2S3-Fc1/Fc2 (molécula de Fc heterodimérico con un dominio de U2S3 individual y sin citocinas o mutantes de citocina unidos) y el ritixumab-MicAbody (bivalente para el dominio de U2S3 pero que carece de cualquier componente de citocina, figura 13Bb) no indujo proliferación durante el transcurso de tres días de cultivo, incluso a concentraciones de IUe/mL mucho más altas que con el control de rhIL2 (Figura 16C).

[0083] Ejemplo 8: La presencia de dominios coestimulantes intracelulares, ya sea en *cis* o *trans*, promueve la capacidad de respuesta de células que portan NKG2D no natural y modificado a citocinas y citocina-MicAdaptor

[0084] Después de la demostración de que el dominio e NKG2D.YA modificado, en el contexto de un constructo de receptor de antígeno quimérico, de hecho sirvió como un sitio de acoplamiento altamente selectivo para la administración de carga heteróloga unida a un ligando ortogonal, se busca determinar si el receptor NKG2D.YA no sólo era necesario sino también suficiente para la administración dirigida de citocinas que entonces podrían actuar en la célula receptora. El dominio extracelular de NKG2D.YA (NKG2D.YA-ecd) se expresó como un dominio transmembrana privado de todos los componentes intracelulares con la excepción de la retención de una etiqueta de eGFP intracelular (figura 14, SEQ ID NO: 157). Las células de CD8 se transdujeron para expresar este “CAR imperceptible” y demostraron ser incapaces de aniquilar directamente las células diana Ramos en la presencia de un rituximab-MicAbody ULBP2.S3 (SEQ ID NO: 98 y 129) como se esperaría sin dominios coestimulantes (figura 16A). De manera importante, las células que expresan este CAR completamente inerte o imperceptible no proliferaron cuando se expusieron a U2S3-Fc1/Fc2-mutIL2 (SEQ ID NO: 189 y 193), pero respondió a un nivel comparable a células no transducidas (figura 16B). Esta observación, además de (a) la observación consistente de mayores niveles de proliferación de NKG2D.YA-CAR con rhIL2 en comparación a células no transducidas (figuras 15C, 16B, 16C) y (b) la observación de que sólo las células de NKG2D.YA-CAR respondieron a todas las formas de IL21-MicAdaptor incluyendo IL21.wt, condujo a especular que los dominios intracelulares presentes en el constructo de NKG2D.YA-CAR potenciaron la capacidad de respuesta a estas citocinas y citocina-MicAdaptor.

[0085] Para examinar esto, se generó una serie de constructos de CAR donde se mutaron los motivos de señalización de los dominios intracelulares del CAR, cualquiera de los dos sitios de unión de consenso de TRAF2 de 4-1BB (SEQ ID NO: 161), los tres pares de motivos ITAM en CD3-zeta (SEQ ID NO: 163), o mutantes de 4-1BB/CD3-zeta combinados (SEQ ID NO: 165). Estos constructos (figura 14) se transdujeron en células de CD8, se co-incubaron con los reactivos de citocina indicados y la proliferación se cuantificó después de tres días (figura 17A). NKG2D.YA-BB-CD3 Δ ITAM-GFP (SEQ ID NO: 163) retuvo una

respuesta proliferativa a la par de NKG2D.YA-CAR en todas las condiciones probadas, por lo cual se demostró que el dominio de CD3-zeta (SEQ ID NO: 145) es dispensable para la capacidad de respuesta a tanto citocinas como citocina-MicAdaptor en el contexto de un CAR. Sin embargo, células que expresan el receptor de NKG2D.YA-BB_ΔTRAF2-CD3zeta-GFP (SEQ ID NO: 161) tuvieron capacidad de respuesta significativamente reducida a todas las citocinas y citocina-MicAdaptor, como lo hicieron el NKG2D.YA-BB_ΔTRAF2-CD3_ΔITAM-GFP (SEQ ID NO: 165) mutaciones que portan receptor en ambos dominios intracelulares. Esto indicó que el 4-1BB coestimulante (SEQ ID NO: 143) desempeñó una función en la capacidad de respuesta de células de NKG2D.YA-CAR tanto a citocinas como a citocina-MicAdaptor y que un CAR imperceptible expresado en una superficie celular también necesita tener un dominio coestimulante intracelular presente para promover la capacidad de respuesta de citocina-MicAdaptor. La *incapacidad* de un CAR imperceptible de NKG2D.YA-BB (SEQ ID NO: 169, figura 14) para dirigir la aniquilación celular mediada por MicAbody (figura 17B) demostró que esta arquitectura de CAR que carecía de CD3-zeta era adecuada como el sitio de acoplamiento imperceptible para MicAdaptor y se permitió la señalización de citocina-MicAdaptor, pero no funcionaba para mediar la citólisis de una célula dirigida a MicAbody.

[0086] Para explorar adicionalmente cómo el dominio de 4-1BB contribuye a la capacidad de respuesta de citocinas y citocina-MicAdaptor, se generó un constructo donde un CD19scFv-CAR (con base en Fv de FMC63), que contiene el complemento completo de dominios de 4-1BB y CD3-zeta funcionales (SEQ ID NO: 173). El CD19scFv-CAR se coexpresó con el NKG2D.YA-ecd (figura 14). Ambos componentes se expresaron como un polipéptido individual con un motivo de péptido de autoescisión de T2A que separaba el constructo de CD19scFv-CAR en dirección 5' del NKG2D.YA-ecd en dirección 3' que poseía una secuencia de señal de cadena alfa de GMCSFR independiente, bisagra de CD8a, y dominio transmembrana de CD8a. Este constructo se transdujo en células T de CD8, y la coexpresión del CD19scFv-CAR y el NKG2D.YA-ecd en la superficie se verificó por citometría de flujo que examina la señal de GFP y tinción de

MicAbody conjugada con ficoeritrina, respectivamente. Estas células se incubaron durante tres días con citocinas y citocina-MicAdaptor y proliferación cuantificada por ensayo de WST. El NKG2D.YA-CAR respondió tanto a rhIL2 como a U2S3-Fc1/Fc2-mutIL2 como se esperaba, aunque las células de control que albergan sólo el CD19scFv-CAR (SEQ ID NO: 171) expandido con rhIL2 y a un menor grado a la concentración más alta (300 IUe/mL) de U2S3-Fc1/Fc2-mutIL2 (figura 17C). Coexpresión de NKG2D.YA-ecd en células que expresan CD19scFv-CAR (SEQ ID NO: 173) exhibieron mayor respuesta proliferativa al citocina-MicAdaptor de U2S3-Fc1/Fc2-mutIL2 que las células que expresan sólo CD19scFv-CAR (SEQ ID NO: 171). En este contexto, el dominio de 4-1BB se proporcionó constitutivamente en *trans* a NKG2D.YA-ecd. Estos datos demostraron que la capacidad de respuesta de las células que expresan NKG2D.YA-ecd a citocinas y citocina-MicAdaptor se promovió por el dominio de 4-1BB ya sea en *cis* o *trans* y que el dominio de NKG2D.YA-ecd se puede coexpresar con una célula de CAR que contiene 4-1BB coestimulante para proporcionar funcionalidad versátil adicionada a células modificadas de estrategias de terapia celular adoptiva. Esta funcionalidad no sólo se limita al acoplamiento de receptores de superficie después del acoplamiento de ligando/CAR imperceptible, sino que se podría extender a la administración intracelular por la incorporación de motivos de secuencia citoplasmática (K.N. Pandey, Functional roles of short sequence motifs in the endocytosis of membrane receptors, 2009 Front Biosci, 14:5339, PMID: 19482617) que promueven la rotación de variantes NKG2D no naturales tal que cualquier MicAdaptor unido se cointernalice y la carga heteróloga se administre intracelularmente..