

MODIFICACIÓN DE CÉLULAS NK CON UNA CONSTRUCCIÓN DE CAR CON SEÑALIZACIÓN ÓPTIMA

[1] Esta solicitud invoca prioridad a la Solicitud de Patente Provisional de los EE.UU. No. de Acta 63/257.608, presentada el 20 de octubre de 2021.

[2] La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que ha sido presentado en formato XML y que se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad. Dicha copia XML, creada el 11 de octubre de 2022, tiene el nombre MDAC_1299WO_Sequence_Listing_ST26.xml y tiene 13.926 bytes de tamaño.

I. Campo Técnico

[3] Las formas de realización de la divulgación incluyen por lo menos los campos de la biología celular, biología molecular, inmunología y medicina, que incluye medicina contra el cáncer.

II. Antecedentes

[4] En los últimos años, se ha probado que la terapia celular adoptiva usando células T autólogas transducidas con un receptor quimérico de antígenos (CAR) es un abordaje muy poderoso para el tratamiento del cáncer, que llevó a la aprobación por parte de la FDA en leucemia/linfoma de células B.¹⁻³ Sin embargo, aún existen desafíos, que incluyen desacoplar la citotoxicidad contra las células tumorales de la toxicidad sistémica, encontrando soluciones para recaídas negativas para el antígeno diana, y desarrollando productos de terapia celular disponibles para evitar los obstáculos de logística de la generación de productos autólogos a la vez que se administran asuntos que surgen con los productos de células T alogénicas.⁴ Las células asesinas naturales (NK) son candidatos atractivos para el diseño de CAR ya que median

la citotoxicidad eficaz contra células tumorales y, a diferencia de las células T, carecen del potencial de provocar enfermedad de injerto contra el huésped (GVHD) en el contexto alogénico.⁵ Por lo tanto, las células NK podrían volverse disponibles como un producto de terapia celular disponible para el uso clínico inmediato. Las células CAR-NK también retienen su capacidad intrínseca de reconocer y estar dirigidas contra células tumorales diana a través de sus receptores nativos, haciendo por lo tanto en principio, que el escape de la enfermedad a través de la disminución en la expresión del antígeno diana del CAR sea menos probable que lo que se observa con las células CAR-T.⁶ La sangre de cordón (CB) es una fuente existente fácilmente “disponible” de células NK alogénicas que (a modo de ejemplo) se pueden expandir a dosis grandes, muy funcionales, usando células presentadoras de antígeno universales (uAPC) que cumplen con las GMP que son células K562 modificadas para expresar CD48, 4-1BBL, e IL-21 unida a membrana (mbIL21).⁷

[5] La presente divulgación satisface la gran necesidad en el arte de una terapia celular adoptiva para proveer células NK muy eficaces que tengan la capacidad de estar dirigidas contra antígenos deseados mediante configuraciones de CAR particulares.

SÍNTESIS BREVE

[6] Las formas de realización de la divulgación incluyen métodos y composiciones relacionadas con terapias celulares adoptivas para individuos que lo requieren, que incluyen terapias celulares en las cuales las células son células NK modificadas. Las células NK modificadas expresan proteínas sintéticas particulares que las hace particularmente eficaces para el tratamiento

de una condición médica particular, tal como permitiendo que las células NK tengan una eficacia mejorada contra células contra las cuales están dirigidas las proteínas sintéticas.

[7] En formas de realización particulares, la presente divulgación se refiere a construcciones de receptor quimérico de antígenos que comprenden el dominio coestimulador de DAP10 (que es más relevante para la biología de las células NK, en comparación con la biología de las células T) en combinación con un dominio transmembrana de DAP10 o dominio transmembrana de CD28, y/u opcionalmente en combinación con una bisagra de CD28. Dichas construcciones CAR que comprenden DAP10 resultan en una actividad antitumoral potenciada de células CAR-NK en comparación con los otros dominios coestimuladores, tales como dominios coestimuladores de CD28 que son más específicos de la biología de las células T. En formas de realización específicas, dichas construcciones se utilizan para mejorar las terapias celulares con CAR-NK adoptivas, y el mejorar la potencia permite el uso de un número bajo de CAR-NK (o células CAR-T, en casos alternativos) contra individuos que lo requieren para reducir el riesgo de toxicidad.

[8] Las formas de realización particulares de la divulgación abarcan terapia celular adoptiva con células CAR-NK (u otros vehículos CAR alternativos) para tratar a pacientes con cualquier tipo de malignidad hematológica, cáncer sólido, y/o enfermedad infecciosa.

[9] Las formas de realización de la divulgación incluyen polinucleótidos que codifican para una proteína de fusión, en donde dicha proteína de fusión comprende: (a) opcionalmente una bisagra de CD28; y (b1) un dominio transmembrana de CD28, o (b2) un dominio transmembrana de DAP10; y (c)

un dominio coestimulador de DAP10. En formas de realización específicas, la proteína de fusión se define además como un receptor quimérico de antígeno (CAR). En algunos casos, el CAR además comprende uno o más dominios de unión a antígeno, en donde un dominio de unión a antígeno está dirigido contra un antígeno cancerígeno (tumores sólidos o malignidades hematológicas) o un agente infeccioso. En casos específicos, el CAR además comprende CD3zeta, tal como uno que comprende la SEQ ID NO:3. El polinucleótido puede codificar para el dominio transmembrana de CD28 comprendido en la SEQ ID NO:1. En determinadas formas de realización, el CAR además comprende uno o más dominios coestimuladores adicionales, tal como uno o más dominios coestimuladores adicionales seleccionados del grupo que consiste en CD28, DAP12, 4-1BB, NKG2D, 2B4, y una combinación de los mismos. El CAR puede o no comprender además un péptido señal, tal como un péptido señal del CD8, del CD27, del receptor del factor estimulante de colonia de granulocitos y macrófagos (GMSCF-R), de la cadena pesada de Ig (IgH), del CD3, o del CD4, a modo de ejemplo.

[10] En formas de realización particulares, los polinucleótidos de la divulgación incluyen aquellos que además codifican para uno o más polipéptidos adicionales de interés. La secuencia que codifica para uno o más polipéptidos adicionales de interés y la secuencia que codifica para el CAR pueden estar separadas en el polinucleótido mediante un elemento 2A o IRES. En ciertos casos, el polipéptido adicional de interés es una o más proteínas terapéuticas y/o proteínas que aumentan la actividad, expansión, citotoxicidad, y/o persistencia de la célula. En algunos casos, el polipéptido adicional de interés es un producto de gen suicida, una o más citoquinas (IL-15, IL-2, IL-12,

IL-18, IL-21, IL-23 y/o IL-7, por ejemplo), y/o una o más proteínas humanas o virales que aumentan la proliferación, expansión y/o salud metabólica. En casos en los que una citoquina es IL-15, la secuencia de la IL-15 puede comprender la SEQ ID NO:8.

[11] En formas de realización particulares, un vector de cualquier tipo comprende cualquier polinucleótido de la divulgación, que incluye un vector viral, tal como un vector adenoviral, vector viral adenoasociado, vector lentiviral, o vector retroviral, o un vector no viral, tal como un plásmido. En la divulgación también se abarcan células de cualquier tipo que comprenden cualquier polinucleótido abarcado en la presente y/o cualquier vector abarcado en la presente. La célula puede ser una célula madre o una célula del sistema inmunológico, o una mezcla de las mismas. Las células específicas del sistema inmunológico incluyen las siguientes: célula asesina natural (NK), célula T, célula T gamma delta, célula T alfa beta, célula NKT invariante (iNKT), célula B, macrófago, célula del estroma mesenquimatoso, célula dendrítica, o una mezcla de las mismas. Cuando la célula del sistema inmunológico es una célula NK, la célula NK puede derivar de sangre de cordón, sangre periférica, células madre pluripotentes inducidas, células madre hematopoyéticas, de médula ósea, o de una línea celular, tal como una célula NK derivada de la línea celular NK-92. La célula NK puede derivar de una célula mononuclear de sangre de cordón. La célula NK puede ser una célula NK CD56+. En formas de realización específicas, la célula NK expresa una citoquina recombinante, tal como IL-15, IL-2, IL-12, IL-18, IL-21, IL-7 y/o IL-23. En la presente también se incluyen poblaciones de células del sistema inmunológico o células madre que expresan una o más moléculas de CAR de la divulgación. Cuando las células

expresan más de un tipo de molécula de CAR, los CAR pueden estar dirigidos contra diferentes antígenos, tal como para potenciar la capacidad de unirse de manera específica a la o las células deseadas. La población puede o no comprender una mezcla de células de cualquier tipo.

[12] Las formas de realización de la divulgación incluyen métodos para matar células cancerígenas en un individuo, que comprenden la administración al individuo de una cantidad eficaz de cualquiera de las células que portan cualquier polinucleótido abarcado en la presente y/o cualquiera de las células que portan cualquier vector abarcado en la presente. En formas de realización específicas, las células que portan el polinucleótido son células del sistema inmunológico, tales como células NK, células T, células T gamma delta, células T alfa beta, células iNKT, células B, macrófagos, células dendríticas, o una mezcla de las mismas. Las células del sistema inmunológico pueden comprender células NK, en donde las células NK derivan de sangre de cordón (que incluyen células mononucleares CB), de sangre periférica, de células madre pluripotentes inducidas, de células madre hematopoyéticas, de médula ósea, de una línea celular, o una mezcla de las mismas. Las células del sistema inmunológico pueden ser autólogas o alogénicas respecto al individuo. En formas de realización particulares de los métodos, las células que portan el polinucleótido y/o células que portan el vector se administran al individuo una vez o más de una vez, y la duración de tiempo entre las administraciones de las células que portan el polinucleótido al individuo puede ser entre 1 y 24 horas, entre 1 y 7 días, entre 1 y 4 semanas, entre 1 y 12 meses, o uno o más años. Los métodos además pueden comprender el paso de proveer al individuo una cantidad eficaz de una terapia adicional, tal como una cirugía, radiación,

terapia génica, inmunoterapia, o terapia con hormonas. Las células que portan el polinucleótido y/o las células que portan el vector se pueden administrar al individuo mediante infusión, inyección, por vía intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intratraqueal, intratumoral, intramuscular, endoscópica, intralesión, intracraneal, percutánea, subcutánea, regional, mediante perfusión, en un microambiente tumoral, o una combinación de las mismas.

[13] Lo anterior ha descrito de manera amplia las características y ventajas técnicas de la presente divulgación con el objetivo que se comprenda mejor la siguiente descripción detallada. A partir de aquí se describirán características y ventajas adicionales que forman el sujeto de las reivindicaciones de la presente. Aquellos expertos en el arte deben apreciar que la concepción y las formas de realización específicas descritas se pueden utilizar fácilmente como base para modificar o diseñar otras estructuras para lograr los mismos propósitos de los diseños de la presente. Aquellos expertos en el arte también se deben dar cuenta que dichas construcciones equivalentes no se apartan del espíritu y alcance como se describe en las reivindicaciones anexas. Las características novedosas que se creen que son características de los diseños descritos en la presente, como la organización y el método de operación, junto con otros objetos y ventajas se comprenderán mejor a partir de la siguiente descripción cuando sean considerados en relación a las figuras anexas. Sin embargo, se debe comprender de manera expresa que cada una de las figuras se provee con el propósito de ilustración y descripción solamente y no pretenden ser una definición de los límites de la presente divulgación.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

[14] Para una comprensión más completa de la presente divulgación, a continuación se hace referencia a las siguientes descripciones junto con las figuras anexas.

[15] Figuras 1A-1B. Fenotipificación usando un panel de citometría de masas. 1A. Gráficos de fenografía de TSNE que muestran diferentes agrupaciones en células no transducidas NT (izquierda) y transducidas con CD28TMDAP10CD3z CD5CAR-NK. Los agrupamientos están numerados con una leyenda de código de color como se indica por debajo de los fenográficos. Los 2 agrupamientos nuevos (#8 y #11) expresados en células NK CARCD5 están resaltados mediante los círculos y los rectángulos. 1B. Mapa de calor que muestra la expresión normalizada de diferentes marcadores (indicado en el eje X) en cada agrupamiento (indicado en el eje Y). Los marcadores de activación, citotoxicidad y maduración con expresión alta en los agrupamientos #8 y #11 están resaltados con los rectángulos.

[16] Figuras 2A-2C. Datos de secretoma de células individuales de Isoplexis que muestran la polifuncionalidad de células CAR-NK CD5 con dominio coestimulador de DAP10. 2A. Gráfico de barras en el que se muestra el porcentaje de polifuncionalidad de diferentes células CAR-NK CD5 en comparación con células NK no transducidas (NT). 2B. Gráfico de barras en el que se muestra el índice de potencia de polifuncionalidad entre las diferentes células CAR-NK CD5 en comparación con células NK no transducidas (NT). 2C. Mapa de calor de polifuncionalidad que muestra cuales construcciones tienen la mayor capacidad de secretar diferentes permutaciones de citoquinas a nivel de célula única.

[17] Figuras 3A-3C. Experimento de ensayo de muerte de Incucyte con múltiples reenfrentamientos con tumores. 3A. Diagrama esquemático en el que se muestra una forma de realización de un diseño experimental y metodología del experimento de reenfrentamiento del ensayo de muerte de Incucyte. 3B. Gráfico en el que se muestra la medida de rojo (eje y; una medida del recuento de células tumorales vivas) después de cada reenfrentamiento tumoral (indicado por la flecha) entre las diferentes condiciones de células CAR-NK CD5. 3C. Gráfico en el que se muestra el porcentaje de confluencia (una medida de la abundancia del tumor) después de cada reenfrentamiento de tumor (indicado por las flechas).

[18] Figuras 4A-4B. Ensayo metabólico Seahorse para medir la tasa de consumo de oxígeno (OCR) y la tasa de acidificación extracelular (ECAR) entre diferentes células CAR-NK CD5. 4A. Gráfico en el que se muestra la OCR entre los diferentes diseños de células CAR-NK CD5 en comparación con células NK no transducidas (NT). 4B. Gráfico en el que se muestra la ECAR entre los diferentes diseños de célula CAR-NK CD5 en comparación con células NK no transducidas (NT).

[19] Figuras 5A-5C. Las células CAR-NK CD5 con dominio coestimulador de DAP10 muestran buena actividad en un modelo de ratón PDX de linfoma de células del manto. 5A. Gráfico de barras en el que se muestra el número absoluto de células CD45+CD5+ (en el tumor subcutáneo en ratones que recibieron solo tumor (izquierda) respecto a tumor más CD5CAR-NK (derecha) en el tumor subcutáneo. 5B. Gráfico de barras en el que se muestra el número absoluto de células CD45+CD5+ en el tumor subcutáneo en ratones que recibieron solo tumor (izquierda) respecto a tumor más CD5CAR-NK (derecha)

en el bazo. 5C. Gráfico de barras en el que se muestra el número absoluto de células CD45+CD5+ en el tumor subcutáneo en ratones que recibieron solo tumor (izquierda) respecto a tumor más CD5CAR-NK (derecha) en la médula ósea.

[20] Figuras 6A-6B. Las células CAR-NK CD27 con dominio coestimulador de DAP10 mejoran el control del tumor y la supervivencia en un modelo de ratón NSG de leucemia mieloide aguda (THP-1) transducido con luciferasa de luciérnaga (FFLuc). 6A. Series de imágenes de bioluminiscencia (BLI) que muestran la carga tumoral como luminiscencia de THP-1 FFLuc entre los diferentes grupos de ratones. 6B. Curva de supervivencia en la que se muestra la supervivencia de los diferentes grupos ratones en el tiempo.

[21] Figuras 7A-7B. En la Figura 7A se ilustran diferentes identificaciones de construcciones y la correspondiente eficacia de transducción (Figura 7B). Las células CB-NK se transdujeron con diferentes construcciones CD5 CAR, como se muestra en la Figura 7A, y se midió la eficacia de transducción mediante citometría de flujo. La eficacia de transducción se basa en el porcentaje de células positivas (Figura 7B). En la Figura 7B, las barras de izquierda a derecha en el gráfico de barras corresponde a aquellas en la leyenda tal como se lee de arriba hacia abajo.

[22] En la Figura 8 se provee un ejemplo de un plan experimental de inyección a ratones con diferentes construcciones de CD5 y un curso en el tiempo correspondiente. En el esquema se muestra el ensayo de actividad antitumoral *in vivo* de diferentes células NK CAR contra CD5 contra la línea celular de linfoblastoides T CCRF-CEM como diana.

[23] Figuras 9A-9B. En las Figuras 9A y 9B se muestra que los ratones tratados con NK CAR anti-CD5 con células con bisagra de IgG1 sobreviven significativamente más tiempo que las células NK NT y tumor solo. Se muestran imágenes de bioluminiscencia de ratones en cada grupo (Figura 9A), y la cuantificación de la señal de luciferasa se muestra en la Figura 9B.

[24] Figuras 10A-10B. En las Figuras 10A y 10B se demuestra que los ratones tratados con NK CAR anti-CD5 con bisagra de CD28 reducen significativamente la carga tumoral en comparación con el tumor solo, células NK NT y células NK CAR CD5 con bisagra de IgG1. Las imágenes de bioluminiscencia de ratones en cada grupo se proveen en la Figura 10A, y la cuantificación de la señal de luciferasa se muestra en la Figura 10B.

[25] Figura 11. Las células CAR-NK CD5 con señalización por DAP10 muestran evidencia de alta proliferación y ventaja metabólica a nivel transcriptómico de célula única. El mapa de calor que muestra el análisis de enriquecimiento de vía de señalización de los datos de scRNAseq comparando células NK CD5CAR-DAP10-CD3z, CD5CAR-CD3z y NT. N=2.

[26] Figura 12. Las células CAR-NK CD5 con señalización por DAP10 presentan enriquecimiento de TF relacionado con el complejo AP1 y la familia BATF a nivel epigenético de célula única. El gráfico de volcán muestra el análisis de enriquecimiento de TF de los datos de scATACseq comparando CD5CAR-DAP10-CD3z y CD5CAR-CD3z. N=2.

[27] Figuras 13A-13B. Las células CAR-NK CD5 con señalización por DAP10 muestran activación aumentada a nivel proteómico por RPPA. 13A. El mapa de calor del análisis por RPPA muestra los datos de expresión de proteína en Log2 de CD5CAR-DAP10-CD3z y CD5CAR-CD3z normalizado a

células NK NT antes de la estimulación (sin estim) y luego de la estimulación con el antígeno diana CD5 durante 2 min y 15 min. 13B. Análisis de la red de vías de señalización que muestran la interacción entre diferentes vías de señalización proteicas relacionadas con la proliferación, capacidad de célula madre, actividad metabólica, formación de sinapsis inmunológicas y características de memoria. N=2.

[28] Figuras 14A-14B. Las células CAR-NK CD5 con señalización por DAP10 persisten y tienen la capacidad de montar una respuesta de memoria luego del reenfrentamiento con el tumor *in vivo*. 14A. Diagrama esquemático que muestra los detalles del plan experimental delo modelo de ratón *in vivo* mostrando los tiempos de radiación, tiempos de inyección del tumor CD5+CCRF, tiempos de la infusión de células CAR-NK CD5 y tiempos del reenfrentamiento con el tumor CCRF CD5+ (transducido con FFLuc-GFP). 14B. Gráficos de FACS en los que se muestran los datos de citometría de flujo antes del reenfrentamiento (paneles laterales de la izquierda) y luego del reenfrentamiento (paneles laterales de la derecha) mostrando la ventana de CD45+ de humano seguido por la ventana de células NK (CD56+ y GFP-). Esto muestra que las células CAR-NK CD5 se expanden después del reenfrentamiento con el tumor y pueden montar una respuesta de memoria contra el tumor CD5+CCRF.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

EJEMPLOS DE DEFINICIONES

[29] De acuerdo con convenciones de larga data aplicables a las patentes, las palabras “uno/a” y “un” cuando se usan en la presente memoria descriptiva en relación con la palabra que comprende, incluyendo las

reivindicaciones, se refiere a “uno/a o más”. Algunas formas de realización de la divulgación pueden consistir o consistir esencialmente en uno o más elementos, pasos de un método, y/o métodos de la divulgación. Se contempla que cualquier método o composición descrito en la presente puede ser implementado respecto a cualquier otro método o composición que se describe en la presente y que se pueden combinar diferentes formas de realización.

[30] A lo largo de esta memoria descriptiva, a menos que el contexto lo requiera de otra manera, se interpretará que las palabras “comprenden”, “comprende” y “que comprende” implican la inclusión de un paso o elemento o grupo de pasos o elementos mencionados sin la exclusión de cualquier otro paso o elemento o grupo de pasos o elementos. El término “que consiste en” designa a la inclusión y la limitación a cualquier elemento que siga a la expresión “que consiste en.” Por lo tanto, la expresión “que consiste en” indica que los elementos que se enumeran son requeridos u obligatorios, y que no pueden estar presentes otros elementos. El término “que consiste esencialmente en” incluye a cualquier elemento enumerado después de la expresión, y limitado a otros elementos que no interfieran o contribuyan con la actividad o acción que se especifica en la divulgación para los elementos enumerados. Por lo tanto, la expresión “que consiste esencialmente en” indica que los elementos enumerados son requeridos u obligatorios, pero que ningún otro elemento es opcional y puede estar presente o no dependiendo de si afecta o no la actividad o la acción de los elementos enumerados.

[31] La referencia a lo largo de esta memoria descriptiva a “1 forma de realización,” “una forma de realización,” “una forma de realización particular,” “una forma de realización relacionada,” “cierta forma de realización,” “una forma

de realización adicional,” u “otra forma de realización” o combinaciones de los mismos, significa que se incluye un rasgo, estructura o característica particular descrita en conexión con la forma de realización en por lo menos una forma de realización de la presente invención. Por lo tanto, las apariciones de las anteriores frases en diversas ubicaciones a lo largo de esta memoria descriptiva no necesariamente se refieren todas a la misma forma de realización. Más aún, los rasgos, estructuras o características particulares se pueden combinar de cualquier forma adecuada en una o más formas de realización.

[32] Como se usan en la presente, los términos “o” e “y/o” se utilizan para describir múltiples componentes combinados o de manera exclusiva entre sí. Por ejemplo, “x, y, y/o z” se puede referir a “x” solo, “y” solo, “z” solo, “x, y y z”, “(x e y) o z”, “x o (y y z)”, o “x o y o z”. Se contempla de manera específica que x, y, o z pueden estar excluidos de manera específica en una forma de realización.

[33] A lo largo de esta solicitud, el término “aproximadamente” se usa de acuerdo con su significado simple y ordinario en el área de la biología celular y molecular para indicar que un valor incluye la desviación estándar del error del dispositivo o método que se está empleando para determinar el valor.

[34] El término “modificado” como se usa en la presente se refiere a una entidad que está generada por la acción del hombre, incluyendo una célula, ácido nucleico, polipéptido, vector, etc.. En al menos algunos casos, una entidad modificada es sintética y comprende elementos que no se encuentran presentes de manera natural o configurados de una manera en la cual se utilizan en la divulgación.

[35] El término "aislado" como se usa en la presente se refiere a moléculas o materiales biológicos o celulares que están sustancialmente libres de otros materiales. En un aspecto, el término "aislado" se refiere a ácido nucleico, tal como ADN o ARN, o proteína o polipéptido, o célula u organela celular, o tejido u órgano, separado de otros ADN o ARN, o proteínas o polipéptidos, o células u organelas celulares, o tejidos u órganos, respectivamente, de manera que están presentes en la fuente natural. El término "aislado" también se refiere a un ácido nucleico o péptido que está sustancialmente libre de material celular, material viral, o medio de cultivo cuando se elabora mediante técnicas de ADN recombinante, o precursores químicos u otros químicos cuando se sintetizan de manera química. Además, un "ácido nucleico aislado" se refiere a que incluye fragmentos de ácido nucleico que no son fragmentos de origen natural y que no se encontrarían en el estado natural. El término "aislado" también se usa en la presente para referirse a polipéptidos que son aislados de otras proteínas celulares y se pretende que abarque los polipéptidos purificados y recombinantes. El término "aislado" también se usa en la presente para referirse a células o tejidos son aislados de otras células o tejidos y se pretende que abarque células o tejidos cultivados o diseñados.

[36] Como se usa en la presente, "prevenir", y palabras similares tales como "prevenido", "que previene", etc., indican una estrategia para prevenir, inhibir o reducir la posibilidad de aparición o recurrencia de, una enfermedad o condición, por ejemplo, cáncer. También se refiere a retrasar el inicio o recurrencia de una enfermedad o condición o retrasar la aparición o recurrencia de los síntomas de una enfermedad o condición. Como se usa en la presente,

“prevención” y palabras similares también incluyen la reducción de la intensidad, efecto, síntomas y/o carga de una enfermedad o condición antes del inicio o recurrencia de la enfermedad o condición.

[37] El término “muestra”, como se usa en la presente, en general se refiere a una muestra biológica. La muestra puede ser tomada de tejido o células de un individuo. En algunos ejemplos, la muestra puede comprender, o derivar de, una biopsia de tejido, sangre (por ejemplo, sangre entera), plasma de sangre, fluido extracelular, manchas de sangre secas, células cultivadas, tejido descartado. La muestra puede haber sido aislada de la fuente antes de la recolección. Los ejemplos no limitantes incluyen sangre, líquido cefalorraquídeo, fluido pleural, líquido amniótico, fluido linfático, saliva, orina, heces, lágrimas, sudor o excreciones mucosas, y otros fluidos corporales aislados de la fuente primaria antes de la recolección. En algunos ejemplos, la muestra se aísla de su fuente primaria (células, tejido, fluidos corporales tales como sangre, muestras del ambiente, etc.) durante la preparación de la muestra. La muestra puede o no estar purificada o enriquecida de otra manera respecto a su fuente primaria. En algunos casos la fuente primaria es homogeneizada antes del procesamiento adicional. La muestra puede ser filtrada o centrifugada para eliminar la capa leucocitaria, lípidos, o materia particulada. La muestra también puede ser purificada o enriquecida en ácidos nucleicos, o puede ser tratada con ARNasas. La muestra puede contener tejidos o células que están intactas, fragmentadas, o parcialmente degradadas.

[38] El término “sujeto”, como se usa en la presente, en general se refiere a un individuo que tiene una muestra biológica que está siendo sometida a procesamiento o análisis y, en casos específicos, tiene o se sospecha que

tiene cáncer. El sujeto puede ser cualquier organismo o sujeto animal que es un objeto de un método o material, que incluye mamíferos, por ejemplo, humanos, animales de laboratorio (por ejemplo, primates, ratas, ratones, conejos), ganado (por ejemplo, vacas, ovejas, cabras, cerdos, pavos y gallinas), mascotas hogareñas (por ejemplo, perros, gatos y roedores), caballos y animales no humanos transgénicos. El sujeto puede ser un paciente, por ejemplo, tener o estar sospechado de tener una enfermedad (que puede ser referida como una condición médica), tal como neoplasias benignas o malignas, o cáncer. El sujeto puede estar siendo sometido o haber sido sometido a tratamiento. El sujeto puede ser asintomático. El sujeto pueden ser individuos sanos pero que son deseosos de ser prevenidos contra el cáncer. El término "individuo" se puede usar como sinónimo, en al menos algunos casos. El "sujeto" o "individuo", como se usa en la presente, puede o no ser albergado en una instalación de salud y puede ser tratado como un paciente ambulatorio de una instalación de salud. El individuo puede estar recibiendo una o más composiciones médicas a través de internet. Un individuo puede comprender cualquier edad de un humano o animal no humano y por lo tanto incluye a adultos y jóvenes (es decir, niños) e infantes e incluye individuos *in utero*. No se pretende que el término connote una necesidad de tratamiento médico, por lo tanto, un individuo puede de manera voluntaria o involuntaria ser parte de una experimentación clínica o en apoyo de estudios de ciencia básica.

[39] Como se usa en la presente "tratamiento" o "tratar", incluye cualquier efecto beneficioso o deseado en los síntomas o patología de una enfermedad o condición patológica, y puede incluir incluso reducciones mínimas en uno o más marcadores que se pueden medir de la enfermedad o condición que se

está tratando, por ejemplo, cáncer. El tratamiento puede involucrar opcionalmente la reducción o alivio de síntomas de la enfermedad o condición, o el retraso de la progresión de la enfermedad o condición. “Tratamiento” no necesariamente indica erradicación completa o cura de la enfermedad o condición, o síntomas asociados a la misma.

[40] Cualquier método en el contexto de un propósito o efecto terapéutico, diagnóstico, o fisiológico también se puede describir en el lenguaje de reivindicación de “uso” tal como “Uso de” cualquier compuesto, composición o agente descrito en la presente para lograr o implementar un propósito o efecto terapéutico, diagnóstico o fisiológico descrito.

[41] La presente divulgación se refiere a métodos y composiciones en los que las construcciones de receptor quimérico de antígenos por lo menos en algunos casos son más adecuadas para usar en células NK porque tienen uno o más componentes que son más relevantes para células NK, a diferencia de la biología que sería más adecuada para otras células del sistema inmunológico, que incluye células T. En un ejemplo, dado que CD28 es una molécula coestimuladora relevante para la biología de la célula T y que no se encuentra presente en las células NK, los inventores desarrollaron otros vectores de CAR con moléculas coestimuladoras alternativas más relevantes para la biología de las células NK, tales como DAP10, DAP12, NKG2D y/o 4-1BB, a modo de ejemplo. Tal como se abarca en la presente, los diferentes diseños de CAR con las diferentes moléculas coestimuladoras fueron caracterizadas con el scFv de CD5 o con el dominio extracelular de CD27 como el dominio de unión a antígeno, a pesar de que estos son meramente ejemplos. El dominio coestimulador de DAP10 confiere un fenotipo más activado a las células CAR-

NK, con agrupamientos específicos identificados mediante citometría de masas mostrando expresión aumentada de marcadores de activación, tales como DNAM, NKG2D, CD3z y ZAP70; marcadores de citotoxicidad tales como TRAIL, Granzima B y Perforina; y marcadores de maduración tales como Eomes y T-bet (Figura 1). Además, las células CAR-NK con el dominio coestimulador de DAP10 y el dominio transmembrana de DAP10 o CD28 mostraron una mayor polifuncionalidad en comparación con las células CAR-NK con otros dominios coestimuladores (Figura 2). Importantemente, las células CAR-NK dirigidas contra el CD5 con el dominio coestimulador de DAP10 tuvieron la capacidad de matar la línea celular CCRF T-ALL después de múltiples reenfrentamientos con tumor, mientras que las células CAR-NK con otras moléculas coestimuladoras perdieron la capacidad de matar CCRF con reenfrentamientos con tumor posteriores, posiblemente debido al agotamiento funcional (Figura 3). Desde una perspectiva del metabolismo, las células CAR-NK con dominio coestimulador de DAP10 mostraron una mayor salud metabólica con mayor fosforilación oxidativa, evidenciado por una mayor tasa de consumo de oxígeno (OCR) y una mayor capacidad glicolítica y evidenciado por una mayor tasa de acidificación extracelular (ECAR) (Figura 4). Esto se puede correlacionar con su potencia aumentada, en formas de realización particulares. Esto traducido a una actividad antitumoral potenciada de la construcción DAP10 en un modelo de ratón PDX de linfoma de células del manto ensayando la eficacia de células CAR-NK CD5 (Figura 5) y en un modelo de ratón NSG de leucemia mieloide aguda (THP-1) ensayando la eficacia de células CAR-NK para CD70 (Figura 6). Tal como se muestra en la presente, el DAP10, que es una molécula adaptadora importante corriente

abajo del receptor de activación de NK NKG2D, puede servir como un dominio coestimulador potente para las células CAR-NK y puede potenciar su salud metabólica y su actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo*.

I. Receptores modificados genéticamente

[42] La presente divulgación se relaciona con receptores modificados genéticamente que utilizan uno o más componentes particulares para una eficacia potenciada respecto a otros receptores genéticamente modificados que carecen de componentes particulares. En formas de realización particulares, los receptores opcionalmente comprenden una bisagra. En los casos en los que el receptor comprende un scFv como al menos parte de un dominio extracelular, el receptor puede comprender una bisagra entre el scFv y el dominio transmembrana. En ejemplos específicos, el receptor puede o no comprender una bisagra cuando el dominio extracelular del receptor carece de un scFv, tal como que comprende al menos parte de un dominio extracelular de un receptor endógeno u otro. En casos específicos, los receptores comprenden al menos una bisagra de CD28. En algunos casos, los receptores comprenden por lo menos un dominio transmembrana de CD28. En ciertos casos, los receptores comprenden por lo menos un dominio transmembrana de DAP10. En casos específicos, los receptores comprenden por lo menos un dominio coestimulador de DAP10.

[43] En formas de realización específicas, los receptores mejorados comprenden (incluyendo en la forma de una proteína de fusión) lo siguiente:

[44] (a) opcionalmente una bisagra; y

[45] (b1) un dominio transmembrana de CD28, o

[46] (b2) un dominio transmembrana de DAP10;

[47] (c) un dominio coestimulador de DAP10; y

[48] (d) CD3zeta.

[49] Por lo tanto, en casos específicos, el receptor comprende una bisagra de CD28 (o bisagra de CD8alfa o bisagra de IgG1, a modo de ejemplo), un dominio transmembrana de CD28, y un dominio coestimulador de DAP10. En otros casos, el receptor comprende una bisagra de CD28, un dominio transmembrana de DAP10 y un dominio coestimulador de DAP10. En formas de realización específicas los componentes de (a) (opcionalmente), (b1) o (b2), (c) y (d) se encuentran en la forma de una proteína de fusión y en una dirección N terminal a C terminal se encuentran en el orden de (a) (opcionalmente), (b1) o (b2), (c) y (d). En casos específicos la proteína de fusión carece de (a).

[50] En formas de realización específicas, los componentes de (a) (opcionalmente), (b1) o (b2), (c) y (d) en la forma de una proteína de fusión además comprenden uno o más dominios de unión a antígeno, incluyendo como una configuración de CAR. En formas de realización específicas uno o más dominios de unión a antígeno en una dirección de N terminal a C terminal se encuentran en el extremo N terminal de (a) (opcionalmente), (b1) o (b2), (c) y (d) (en ese orden). En formas de realización específicas, la proteína de fusión como un receptor genéticamente modificado consiste esencialmente de, o consiste en, uno o más dominios de unión a antígeno, (a) (opcionalmente), (b1) o (b2), (c) y (d). Es decir, en casos específicos el receptor genéticamente modificado carece de otros dominios coestimuladores diferentes de DAP10, a pesar de que en casos alternativos el receptor genéticamente modificado comprende uno o más dominios coestimuladores diferentes de DAP10. En dichos casos alternativos en donde el receptor genéticamente modificado

comprende uno o más dominios coestimuladores diferentes de DAP10, el o los otros dominios coestimuladores pueden o no ser dominios coestimuladores que están presentes en una proteína que se encuentra de manera natural en las células NK y no en las células T. Los ejemplos específicos incluyen CD28, DAP12, 4-1BB, NKG2D, 2B4, una combinación de los mismos, etc.

[51] Los componentes de (a) (opcionalmente), (b1) o (b2), (c) y (d) se pueden expresar en un solo polinucleótido como una proteína de fusión y en formas de realización particulares la proteína de fusión comprende uno o más dominios de unión a antígeno. El polinucleótido puede estar aislado o puede estar comprendido en un vector de cualquier tipo, incluyendo un vector viral o no viral. En formas de realización específicas, los vectores están presentes en cualquier tipo de célula incluyendo células del sistema inmunológico, tales como células NK, células T, células T gamma delta, células T alfa beta, células iNKT, células B, macrófagos, células dendríticas, o una mezcla de las mismas. Los métodos de modificación de células adecuados son conocidos en el arte. Véase, por ejemplo, Sambrook y Ausubel, *supra*. Por ejemplo, las células se pueden transducir para que expresen el receptor genéticamente modificado que tiene especificidad antigénica para un antígeno de cáncer o un antígeno de un agente infeccioso usando las técnicas de transducción que se describen en Heemskerk y col., 2008 y Johnson y col., 2009.

[52] En algunas formas de realización, las células comprenden uno o más ácidos nucleicos introducidos mediante ingeniería genética (que codifican para uno o más receptores genéticamente modificados) y expresan los productos genéticamente modificados de dichos ácidos nucleicos. En formas de realización particulares, los ácidos nucleicos son heterólogos, es decir, no

están normalmente presentes en una célula o muestra obtenida de dicha célula, tal como uno obtenido de otro organismo o célula, que por ejemplo, no se halla normalmente en la célula que se está modificando y/o en un organismo del que deriva dicha célula. En algunas formas de realización, los ácidos nucleicos no son de origen natural, tal como un ácido nucleico que no se halla en la naturaleza (por ejemplo, quimérico). Los mismos pueden ser el producto de la acción del hombre.

[53] Los ejemplos de receptores de antígeno, incluyendo a los CAR, así como de métodos para modificar e introducir los receptores en células, incluyen los que se describen, por ejemplo, en las publicaciones de solicitud de patente internacional números WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061 publicaciones de Solicitud de Patente de los EE.UU. números US2002131960, US2013287748, US20130149337, Patentes de los EE.UU. Nos.: 6.451.995, 7.446.190, 8.252.592, 8.339.645, 8.398.282, 7.446.179, 6.410.319, 7.070.995, 7.265.209, 7.354.762, 7.446.191, 8.324.353 y 8.479.118, y Solicitud de Patente Europea número EP2537416, y/o los que se describen en Sadelain y col., 2013; Davila y col., 2013; Turtle y col., 2012; Wu y col., 2012. En algunos aspectos, los receptores de antígeno genéticamente modificados incluyen un CAR como se describe en la Patente de los EE.UU. No.: 7.446.190, y los que se describen en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional No.: WO/2014055668 AI.

[54] En formas de realización particulares, el receptor genéticamente modificado comprende uno o más dominios de unión a antígeno y los componentes de (a), (b1) o (b2) y (c). En formas de realización específicas, el

receptor genéticamente modificado es un CAR, y en algunas formas de realización el dominio de unión a antígeno es un anticuerpo o fragmento funcional del mismo. En otros casos, el dominio de unión a antígeno del CAR no es un anticuerpo o fragmento funcional del mismo pero en su lugar es un ligando natural de un receptor. El CAR puede ser un polipéptido individual que es biespecífico que comprende dos o más dominios de unión a antígeno, en donde uno de los cuales se une a un antígeno deseado y el otro se une a otro antígeno no idéntico.

[55] En algunas formas de realización, los receptores de antígeno modificados incluyen CAR, incluyendo CAR activantes o estimuladores, o CAR coestimuladores (véase WO2014/055668). Los CAR en general incluyen un dominio de unión a antígeno (o ligando) extracelular conectado a uno o más componentes de señalización intracelular, en algunos aspectos a través de los componentes de (a), (b1) o (b2) y (c). Dichas moléculas típicamente son miméticas o parecidas a una señal a través de un receptor de antígeno natural, una señal a través de dicho receptor en combinación con un receptor coestimulador, y/o una señal a través de un receptor coestimulador solo.

[56] Se contempla que la construcción quimérica pueda introducirse en las células del sistema inmunológico como ADN desnudo o en un vector adecuado. Los métodos para transfectar células en forma estable por electroporación usando ADN desnudo son conocidos en el arte. Véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. No. 6.410.319. El ADN desnudo en general se refiere al ADN que codifica para un receptor quimérico contenido en un vector de expresión plasmídico con la orientación apropiada para su expresión.

[57] Como alternativa, se puede usar un vector viral (por ejemplo, un vector retroviral, vector adenoviral, vector viral adenoasociado, o vector lentiviral) para introducir la construcción quimérica de CAR en las células del sistema inmunológico. Los vectores adecuados para usar de acuerdo con el método de la presente divulgación son no replicantes en las células del sistema inmunológico. Se conoce un gran número de vectores que están basados en virus, en donde el número de copias del virus que se mantiene en la célula es lo suficientemente bajo para mantener la viabilidad de la célula, tal como, por ejemplo, vectores basados en HIV, SV40, EBV, HSV o BPV.

[58] Ciertas formas de realización de la presente divulgación se relacionan con el uso de ácidos nucleicos, incluyendo ácidos nucleicos que codifican para un polipéptido de CAR específico que comprende los componentes de (a) (opcionalmente), (b1) o (b2), (c) y (d), incluyendo en algunos casos un CAR que se ha humanizado para reducir la inmunogenicidad (hCAR). En determinadas formas de realización, el CAR puede reconocer un epítipo que comprende el espacio compartido entre uno o más antígenos. En determinadas formas de realización, la región de unión puede comprender regiones determinantes de complementariedad de un anticuerpo monoclonal, regiones variables de un anticuerpo monoclonal, y/o fragmentos de unión a antígeno del mismo. En otra forma de realización, esa especificidad deriva de un péptido (por ejemplo, citoquina) que se une a un receptor.

[59] Está contemplado que los ácidos nucleicos de los CAR de humano pueden ser genes de humano usados para potenciar la inmunoterapia celular para paciente humanos. En una forma de realización específica, la divulgación incluye un ADNc o región codificante de CAR específico de antígeno de

longitud completa. Las regiones o dominio de unión a antígeno pueden comprender un fragmento de las cadenas V_H y V_L de un fragmento variable de cadena individual (scFv) derivado de un anticuerpo monoclonal particular de humano, tal como aquellos descritos en la Patente de los EE.UU. 7.109.304, que se incorpora a la presente a modo de referencia. El fragmento también puede tener cualquier número diferente de dominios de unión a antígeno de un anticuerpo específico de antígeno de humano. En una forma de realización más específica, el fragmento es un scFv específico de antígeno codificado por una secuencia que está optimizada para el uso con codones de humano para la expresión en células de humano.

[60] En algunas formas de realización, un CAR específico de antígeno se construye con especificidad para el antígeno, tal como el antígeno que se expresa en un tipo celular patológico (una célula cancerosa o célula infectada con un agente infeccioso). Por lo tanto, el CAR típicamente incluye en su parte extracelular una o más moléculas de unión a antígeno, tales como uno o más fragmentos de unión a antígeno, dominios, dominios variables de anticuerpo, ligandos, receptores y/o moléculas de anticuerpo de cualquier tipo. Los expertos en la materia son capaces de generar anticuerpos, incluyendo scFv contra el antígeno en base al conocimiento, por lo menos, del polipéptido y prácticas de rutina, aunque en el arte puede haber ya presentes numerosos scFv y anticuerpos monoclonales contra el antígeno. En algunas formas de realización, el scFv específico de antígeno es un scFV de uno o más clones de anticuerpo.

[61] En algunas formas de realización, el CAR específico de antígeno incluye una parte o partes de unión a antígeno de una molécula de anticuerpo,

tal como un fragmento de anticuerpo de cadena individual (scFv) derivado de las cadenas variable pesada (VH) y variable liviana (VL) de un anticuerpo monoclonal (mAb). En formas de realización específicas, el anticuerpo o fragmento funcional del mismo es o deriva de un anticuerpo conocido. El anticuerpo también puede ser uno que se genera *de novo* contra el antígeno, y la secuencia del scFv se puede obtener, o derivar, de dichos anticuerpos *de novo*.

[62] En determinadas formas de realización, el CAR comprende un dominio extracelular que es o que comprende un ligando natural o receptor natural para el antígeno o receptor diana. En algunas formas de realización, el CAR comprende un dominio extracelular que es o que comprende una VH y/o VL de un anticuerpo contra el antígeno.

[63] La secuencia del marco de lectura abierto que codifica para el receptor quimérico puede obtenerse de una fuente de ADN genómico, una fuente de ADNc, o puede sintetizarse (por ejemplo, mediante PCR), o combinaciones de los mismos. Dependiendo del tamaño del ADN genómico y del número de intrones, puede ser deseable el uso de ADNc o una combinación de los mismos como se encuentra que los intrones estabilizan al ARNm. Además, también puede ser ventajoso el uso de regiones no codificantes endógenas o exógenas para estabilizar el ARNm.

[64] En algunos aspectos, el dominio de unión específico de antígeno está conectado al dominio transmembrana de CD28 o de DAP10 y en casos específicos también está conectado al dominio coestimulador de DAP10. En algunos casos, el dominio transmembrana de CD28 o DAP10 se modifica por sustitución de aminoácidos para evitar la unión de dichos dominios a los

dominios transmembrana de las mismas o distintas proteínas de membrana superficial para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor. El dominio transmembrana en algunas formas de realización deriva de una fuente natural o bien de una fuente sintética. Como alternativa, el dominio transmembrana en algunas formas de realización es sintético. En algunos aspectos, el dominio transmembrana sintético comprende predominantemente residuos hidrofóbicos tales como de leucina y valina. En algunos aspectos, se puede hallar un triplete de fenilalanina, triptófano y valina en cada extremo de un dominio transmembrana de CD28 o DAP10 sintético.

[65] En algunas formas de realización, el ácido nucleico del CAR comprende una secuencia que codifica para componentes distintos a DAP10 y, opcionalmente CD3zeta. Además de una señal de activación primaria de células T, tal como la iniciada por CD3 ζ y/o Fc ϵ R1 γ , además de DAP10 se puede utilizar una señal estimuladora adicional para la para la proliferación y la función efectora de las células efectoras inmunológicas después de la unión del receptor quimérico con el antígeno diana. Por ejemplo, se puede usar una parte o todo el receptor coestimulador humano para aumentar la activación de las células, lo que podría mejorar la persistencia *in vivo* y aumentar el éxito terapéutico de la inmunoterapia adoptiva. Los ejemplos incluyen dominios coestimuladores de moléculas tales como DAP12, NKG2D, 2B4, CD2, CD28, CD27, 4-1BB, OX40, ICOS, (CD278), CD30, HVEM, CD40, LFA-1 (CD11a/CD18), y/o ICAM-1, aunque en formas de realización alternativas específicas se puede excluir el uso en el CAR de cualquiera de los enumerados.

II. Ejemplos de Formas de Realización de CAR Específicos

[66] En formas de realización particulares, las moléculas CAR específicas que están abarcadas en la presente comprenden (a) opcionalmente, una bisagra; y (b1) un dominio transmembrana de CD28, o (b2) un dominio transmembrana de DAP10; (c) un dominio coestimulador de DAP10; y (d) CD3zeta. En algunos casos, el CAR además comprende un dominio de unión a antígeno de cualquier tipo y que puede ser un scFv de cualquier tipo. En los casos en los que se usa un scFv en el dominio extracelular del CAR, la cadena pesada variable y la cadena liviana variable del scFv particular pueden estar en cualquier orden en dirección de N terminal a C terminal. Por ejemplo, la cadena pesada variable puede estar del lado N terminal de la cadena liviana variable, o viceversa. El scFv que se une al antígeno en el CAR puede tener o no optimización de codones. En formas de realización particulares, un vector codifica para un CAR específico de antígeno que comprende (a) (opcionalmente), (b1) o (b2), (c) y (d) y también codifica para una o más moléculas adicionales. Por ejemplo, un vector puede codificar para dicho CAR y también puede codificar para otra proteína de interés, tal como uno o más receptores de antígeno modificados adicionales, un gen suicida, y/o una o más citoquinas particulares.

[67] En la misma molécula, el CAR puede comprender uno o más dominios extracelulares específicos de antígeno, tales como para direccionarse a dos antígenos diferentes, y puede haber un conector entre los dos dominios extracelulares específicos de antígeno.

[68] En formas de realización particulares de moléculas CAR específicas, un CAR utiliza dominios coestimuladores de DAP10 pero también utiliza dominios coestimuladores de CD28, DAP12, 4-1BB, NKG2D, u otros diferentes,

incluyendo aquellos abarcados por la presente (que se puede denominar en la presente dominio intracitoplasmático).

[69] Los ejemplos de formas de realización de secuencias específicas para el CAR se proveen a continuación, sin un orden particular:

[70] Secuencia de aminoácidos de dominio transmembrana de CD28:
FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO:1)

[71] Cualquier polipéptido abarcado por la presente divulgación puede comprender la SEQ ID NO:1, o una secuencia que tiene por lo menos 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% o más de identidad con la SEQ ID NO:1.

[72] En los CAR específicos de la divulgación se pueden utilizar o no uno o más dominios intracelulares (que también pueden denominarse en la presente dominios de activación de señal o dominios coestimuladores, en los casos apropiados). Los ejemplos específicos incluyen dominios intracelulares de DAP10 y, en casos particulares, CD3 zeta.

[73] Los ejemplos de dominios intracelulares particulares que se pueden usar en un CAR de la divulgación son los siguientes:

[74] Un ejemplo de una secuencia de aminoácidos de dominio intracelular de DAP10:

LCARPRRSPAQEDGKVYINMPGRG (SEQ ID NO:2)

Cualquier polipéptido abarcado por la presente divulgación puede comprender la SEQ ID NO:2, o una secuencia que tiene por lo menos 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% o más de identidad con la SEQ ID NO:2.

[75] Un ejemplo de una secuencia de aminoácidos de dominio intracelular de CD3zeta:

[76] RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE
MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLS
TATKDTYDALHMQALPPRG (SEQ ID NO:3)

[77] Cualquier polipéptido abarcado por la presente divulgación puede comprender la SEQ ID NO:3, o una secuencia que tiene por lo menos 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% o más de identidad con la SEQ ID NO:3.

[78] En algunos casos, el CAR además comprende un dominio intracelular distinto a DAP10 (y en algunos casos CD3zeta), de la siguiente manera:

[79] Secuencia de aminoácidos de dominio intracelular de 4-1BB:
KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO:4)

Cualquier polipéptido abarcado por la presente divulgación puede comprender la SEQ ID NO:4, o una secuencia que tiene por lo menos 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% o más de identidad con la SEQ ID NO:4.

[80] Secuencia de aminoácidos de dominio intracelular de DAP12:
YFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK
(SEQ ID NO:5)

Cualquier polipéptido abarcado por la presente divulgación puede comprender la SEQ ID NO:5, o una secuencia que tiene por lo menos 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% o más de identidad con la SEQ ID NO:5.

[81] Secuencia de aminoácidos de dominio intracelular de NKG2D:
SANERCKSKVPCRQKQWRTSFDSKKLDLNYNHFESMEWSHRSRGRIG
M (SEQ ID NO:6)

[82] Secuencia de aminoácidos de dominio intracelular de CD28:

RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO:14)

[83] Cualquier polipéptido abarcado por la presente divulgación puede comprender la SEQ ID NO:6, o una secuencia que tiene por lo menos 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% o más de identidad con la SEQ ID NO:6.

[84] En algunas formas de realización de los CAR, hay una región bisagra entre el uno o más dominios extracelulares de unión a antígeno y el dominio transmembrana, y en casos específicos esto ocurre cuando se usa un scFv en el CAR, pero no cuando no hay ningún scFv en el CAR. En formas de realización específicas, la bisagra tiene una longitud particular, tal como entre 10 y 20, entre 10 y 15, entre 11 y 20, entre 11 y 15, entre 12 y 20, entre 12 y 15, o entre 15 y 20 aminoácidos de longitud, por ejemplo. En formas de realización específicas, la bisagra es una bisagra de CD28. En casos específicos, se puede modificar la longitud o la identidad de la bisagra de CD28 para aumentar la eficacia del CAR. Véase, por ejemplo, Hudecek y col. (2014) y Jonnalagadda y col. (2015). En formas de realización específicas, la bisagra es de CD28, CD8alfa o IgG1.

[85] Un ejemplo de una secuencia de aminoácidos de bisagra de CD28 incluye:

IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKP (SEQ ID NO:7)

[86] Cualquier polipéptido abarcado por la presente divulgación puede comprender la SEQ ID NO:7 o una secuencia que tiene por lo menos 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% o más de identidad con la SEQ ID NO:7.

[87] En formas de realización específicas, se pueden usar los siguientes ejemplos de construcciones de expresión para el CAR. Aunque estos CAR son contra CD5, se pueden usar otros antígenos como diana.

[88] La CD5#1 comprende la bisagra de IgG con el dominio transmembrana de DAP12, dominio coestimulador de DAP12, y CD3 zeta.

[89] La CD5#2 comprende la bisagra de IgG con el dominio transmembrana de CD28, dominio coestimulador de DAP12, y CD3 zeta.

[90] La CD5#3 comprende la bisagra de IgG con el dominio transmembrana de CD28, dominio coestimulador de 4-1BB, y CD3zeta

[91] La CD5#4 comprende la bisagra de IgG con el dominio transmembrana de DAP10, dominio coestimulador de DAP10, y CD3 zeta

[92] La CD5#5 comprende la bisagra de IgG con el dominio transmembrana de CD28, dominio coestimulador de DAP10, y CD3 zeta.

[93] La CD5#7 comprende la bisagra de IgG con el dominio transmembrana de CD28, dominio coestimulador de NKG2D, y CD3zeta.

[94] La CD5#8 comprende la bisagra de IgG con el dominio transmembrana de CD28 y CD3zeta.

[95] La CD5#9 comprende la bisagra de IgG1, dominio transmembrana de CD28, dominio coestimulador de CD28, y CD3zeta.

[96] La CD5#10 comprende la bisagra de CD28, dominio transmembrana de CD28, dominio coestimulador de DAP10, y CD3zeta.

[97] La CD5#11 comprende la bisagra de CD28, dominio transmembrana de DAP10, dominio coestimulador de DAP10, y CD3zeta.

[98] La CD5#12 comprende la bisagra de CD28, dominio transmembrana de CD28, dominio coestimulador de DAP12, y CD3zeta.

[99] La CD5#13 comprende la bisagra de CD28, dominio transmembrana de CD28, dominio coestimulador de CD28, y CD3zeta.

[100] Cualquier antígeno adecuado puede ser la diana del presente método. El antígeno puede estar asociado con ciertas células cancerígenas pero no asociado con células no cancerosas, en algunos casos. Los ejemplos de antígenos incluyen, a título enunciativo no taxativo, moléculas antigénicas de agentes infecciosos, auto antígenos, antígenos asociados a tumor/cáncer, y neoantígenos tumorales (Linnemann y col., 2015).

[101] En aspectos particulares, los antígenos están asociados con un cáncer e incluyen CD19, EBNA, CD123, HER2, CA-125, TRAIL/DR4, CD20, CD70, CD38, CD123, CLL1, antígeno carcinoembrionario, alfafetoproteína, CD56, AKT, Her3, antígeno tumoral epitelial, CD319 (CS1), ROR1, proteína de unión a folato, glicoproteína de envoltura de HIV-1 gp120, glicoproteína de envoltura de HIV-1 gp41, CD5, CD23, CD30, HERV-K, IL-11Ralfa, cadena kappa, cadena lambda, CSPG4, CD33, CD47, CLL-1, U5snRNP200, CD200, BAFF-R, BCMA, CD70, TROP-2, CD99, p53, p53 mutada, Ras, ras mutada, c-Myc, serina/treonina quinasas citoplasmáticas (por ejemplo, A-Raf, B-Raf, y C-Raf, quinasas dependientes de ciclina), MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A10, MAGE-A12, MART-1, antígeno asociado a melanoma, BAGE, DAM-6, -10, GAGE-1, -2, -8, GAGE-3, -4, -5, -6, -7B, NA88-A, MC1R, mda-7, gp75, Gp100, PSA, PSM, Tirosinasa, proteína relacionada con tirosinasa, TRP-1, TRP-2, ART-4, CAMEL, CEA, Cyp-B, hTERT, hTRT, iCE, MUC1, MUC2, Fosfoinosítido 3-quinasa (PI3K), receptores TRK, PRAME, P15, RU1, RU2, SART-1, SART-3, antígeno de tumor de Wilms (WT1), AFP, -catenina/m, Caspasa-8/m, CDK-4/m, ELF2M, GnT-V, G250, HAGE, HSP70-

2M, HST-2, KIAA0205, MUM-1, MUM-2, MUM-3, Miosina/m, RAGE, SART-2, TRP-2/INT2, 707-AP, Anexina II, CDC27/m, TPI/mbcr-abl, BCR-ABL, factor regulador de interferón 4 (IRF4), ETV6/AML, LDLR/FUT, Pml/RAR, transductor de señal de calcio asociada a tumor 1 (TACSTD1) TACSTD2, receptores de tirosina quinasa (por ejemplo, receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) (en particular, EGFRvIII), receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), receptor de factor crecimiento vascular endotelial (VEGFR)), VEGFR2, tirosina quinasas citoplasmáticas (por ejemplo, familia src, familia syk-ZAP70), quinasa unida a integrina (ILK), transductores de señal y activadores de la transcripción STAT3, STATS, y STATE, factores inducibles por hipoxia (por ejemplo, HIF-1 y HIF-2), Factor Nuclear Kappa B (NF-B), receptores Notch (por ejemplo, Notch1-4), NY ESO 1, c-Met, diana de mamífero de la rapamicina (mTOR), WNT, quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), y sus subunidades reguladoras, PMSA, PR-3, MDM2, Mesotelina, carcinoma de células renales 5T4, SM22-alfa, anhidrasas carbónicas I (CAI) y IX (CAIX) (también conocida como G250), STEAD, TEL/AML1, GD2, proteinasa 3, hTERT, puntos de ruptura de translocación de sarcoma, EphA2, ML-IAP, EpCAM, ERG (gen de fusión TMPRSS2 ETS), NA17, PAX3, ALK, receptor de andrógeno, ciclina B1, ácido polisiálico, MYCN, RhoC, GD3, fucosil GM1, mesoteliana, PSCA, sLe, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, GLoboH, NY-BR-1, RGsS, SAGE, SART3, STn, PAX5, OY-TES1, proteína de esperma 17, LCK, HMWMAA, AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, legumaína, TIE2, Page4, MAD-CT-1, FAP, MAD-CT-2, antígeno relacionado con fos 1, CBX2, CLDN6, SPANX, TPTE, ACTL8, ANKRD30A, CDKN2A, MAD2L1, CTAG1B, SUNC1, y LRRN1. Los ejemplos de secuencias de antígenos son

conocidos en el arte, por ejemplo, en la base de datos GenBank®: CD19 (No. de Acceso NG_007275.1), EBNA (No. de Acceso NG_002392.2), WT1 (No. de Acceso NG_009272.1), CD123 (No. de Acceso NC_000023.11), NY-ESO (No. de Acceso NC_000023.11), EGFRvIII (No. de Acceso NG_007726.3), MUC1 (No. de Acceso NG_029383.1), HER2 (No. de Acceso NG_007503.1), CA-125 (No. de Acceso NG_055257.1), WT1 (No. de Acceso NG_009272.1), Mage-A3 (No. de Acceso NG_013244.1), Mage-A4 (No. de Acceso NG_013245.1), Mage-A10 (No. de Acceso NC_000023.11), TRAIL/DR4 (No. de Acceso NC_000003.12), y/o CEA (No. de Acceso NC_000019.10).

[102] Los antígenos asociados a tumor pueden derivar de cánceres de próstata, mama, colorrectales, de pulmón, pancreáticos, renales, mesoteliomas, de ovario, hígado, cerebro, hueso, estómago, bazo, testículo, cervical, anal, vesícula biliar, tiroides, o melanomas, por ejemplo. Los ejemplos de antígenos asociados a tumor o antígenos derivados de células tumorales incluyen a MAGE 1, 3, y MAGE 4 (u otros antígenos MAGE tales como los que se divulgan en la Publicación de Patente Internacional No. WO 99/40188); PRAME; BAGE; RAGE, Lage (también conocido como NY ESO 1); SAGE; y HAGE o GAGE. Estos ejemplos no limitantes de antígenos tumorales se expresan en un amplio rango de tipos tumorales tales como melanoma, carcinoma de pulmón, sarcoma, y carcinoma de vejiga. Véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. No. 6.544.518. Los antígenos asociados a tumor de cáncer de próstata incluyen, por ejemplo, al antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), al antígeno específico de próstata (PSA), los fosfatos ácidos de próstata, NKX3.1, y al antígeno epitelial de seis segmentos transmembrana de la próstata (STEAP).

[103] Otros antígenos asociados a tumor incluyen a Plu-1, HASH-1, HasH-2, Cripto y Criptina. Además, un antígeno tumoral puede ser una hormona peptídica propia, tal como la hormona liberadora de hormona gonadotrofina (GnRH) de longitud completa, un péptido corto de 10 aminoácidos de longitud, útil en el tratamiento de muchos cánceres.

[104] Los antígenos pueden incluir regiones epitópicas o péptidos epitópicos derivados de genes mutados de las células tumorales o de genes transcritos a diferentes niveles en las células tumorales en comparación con las células normales, tales como la enzima telomerasa, survivina, mesotelina, ras mutado, rearrreglo bcr/abl, Her2/neu, p53 mutada o de tipo salvaje, citocromo P450 1B1, y secuencias intrónicas expresadas en forma anormal tales como N-acetilglucosaminiltransferasa-V; rearrreglos clonales de genes de inmunoglobulina que generan idiotipos únicos en mieloma y linfomas de células B; antígenos tumorales que incluyen regiones epitópicas o péptidos epitópicos derivados de procesos oncovirales, tales como las proteínas de virus papiloma humano E6 y E7; la proteína del virus de Epstein bar LMP2; proteínas oncofetales no mutadas con una expresión selectiva de tumor, tales como el antígeno carcinoembrionario y la alfa-fetoproteína.

[105] En otras formas de realización, un antígeno se obtiene o deriva de un agente infeccioso, incluyendo un microorganismo patogénico o de un microorganismo patogénico oportunista (también llamado en la presente como microorganismo de enfermedad infecciosa), tal como un virus, hongo, parásito, protozoo y bacteria. En determinadas formas de realización, los antígenos derivados de dicho microorganismo incluyen a proteínas de longitud completa.

[106] Los organismos patogénicos ilustrativos cuyos antígenos se contemplan para usar en el método descrito en la presente incluyen al virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), virus herpes simplex (HSV), virus sincicial respiratorio (RSV), citomegalovirus (CMV), virus de Epstein-Barr (EBV), Influenza A, B, y C, virus de estomatitis vesicular (VSV), virus de estomatitis vesicular (VSV), poliomavirus (por ejemplo, virus BK y virus JC), adenovirus, especies de *Staphylococcus* incluyendo a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), y especies de *Streptococcus* que incluyen a *Streptococcus pneumoniae*. Como lo comprenderán las personas con experiencia en el arte, las proteínas derivadas de estos y de otros microorganismos patogénicos para usar como el antígeno que se describe en la presente, y las secuencias nucleotídicas que codifican para las proteínas, se pueden identificar en publicaciones y en bases de datos públicas tales como GENBANK®, SWISS-PROT®, y TREMBL®.

[107] Los antígenos derivados del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) incluyen a cualquiera de las proteínas estructurales del virión del HIV (por ejemplo, gp120, gp41, p17, p24), proteasa, transcriptasa reversa, o proteínas de HIV codificadas por tat, rev, nef, vif, vpr y vpu.

[108] Los antígenos derivados del virus herpes simplex (por ejemplo, HSV 1 y HSV2) incluyen, a título enunciativo no taxativo, proteínas expresadas a partir de genes tardíos de HSV. El grupo de genes tardíos codifica predominantemente para proteínas que forman la partícula del virión. Dichas proteínas incluyen a las cinco proteínas (UL) que forman la cápside viral: UL6, UL18, UL35, UL38 y la proteína de cápside mayor UL19, UL45, y UL27, cada una de las cuales se puede usar como el antígeno que se describe en la

presente. Otras proteínas ilustrativas de HSV contempladas para usar como antígenos en la presente incluyen a las proteínas ICP27 (H1, H2), glicoproteína B (gB) y glicoproteína D (gD). El genoma del HSV comprende por lo menos 74 genes, en donde cada uno codifica para una proteína que potencialmente se podría usar como antígeno.

[109] Los antígenos derivados de citomegalovirus (CMV) incluyen a las proteínas estructurales de CMV, antígenos virales expresados durante las fases inmediata temprana y temprana de la replicación del virus, glicoproteínas I y III, proteína de cápside, proteína de recubrimiento, proteína de matriz inferior pp65 (ppUL83), p52 (ppUL44), IE1 y 1E2 (UL123 y UL122), productos proteicos del agrupamiento de genes de UL128-UL150 (Rykman, y col., 2006), glicoproteína de envoltura B (gB), gH, gN, y pp150. Como lo han de comprender las personas con experiencia en el arte, las proteínas de CMV para usar como los antígenos descritos en la presente se pueden identificar en bases de datos públicas tales como GENBANK®, SWISS-PROT®, y TREMBL® (véase por ejemplo, Bennekov y col., 2004; Loewendorf y col., 2010; Marschall y col., 2009).

[110] Los antígenos derivados del virus de Epstein-Barr (EBV) que se contemplan para usar en determinadas formas de realización incluyen las proteínas líticas del EBV gp350 y gp110, las proteínas del EBV producidas durante el ciclo latente de la infección incluyendo al antígeno nuclear de Epstein-Barr (EBNA)-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C, la proteína líder de EBNA (EBNA-LP) y las proteínas latentes de membrana (LMP)-1, LMP-2A y LMP-2B (véase, por ejemplo, Lockey y col., 2008).

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

[112] Los antígenos derivados del virus de estomatitis vesicular (VSV) que se contemplan para usar incluyen a cualquiera de las cinco proteínas principales codificadas por el genoma del VSV, y fragmentos antigénicos de las mismas: proteína grande (L), glicoproteína (G), nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), y proteína de matriz (M) (véase, por ejemplo, Rieder y col., 1999).

[113] Los antígenos derivados de un virus de influenza que se contemplan para usar en determinadas formas de realización incluyen a hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), nucleoproteína (NP), proteínas de matriz M1 y M2, NS1, NS2 (NEP), PA, PB1, PB1-F2, y PB2.

[114] Los ejemplos de antígenos virales también incluyen, a título enunciativo no taxativo, polipéptidos de adenovirus, polipéptidos de alfavirus, polipéptidos de calicivirus (por ejemplo, un antígeno de cápside de calicivirus), polipéptidos de coronavirus, polipéptidos de virus distemper, polipéptidos del virus del Ébola, polipéptidos de enterovirus, polipéptidos de flavivirus, polipéptidos del virus de la hepatitis (AE) (un antígeno central o de superficie del virus de la hepatitis B, glicoproteínas E1 o E2, proteínas centrales, o no estructurales del virus de la hepatitis C,), polipéptidos de herpesvirus

(incluyendo a una glicoproteína de virus herpes simplex o de virus zoster de varicela), polipéptidos de virus de peritonitis infecciosa, polipéptidos de virus de leucemia, polipéptidos del virus Marburg, polipéptidos de ortomixovirus, polipéptidos del virus de papiloma, polipéptidos del virus de la parainfluenza (por ejemplo, los polipéptidos hemaglutinina y neuraminidasa), polipéptidos de paramyxovirus, polipéptidos de parvovirus, polipéptidos de pestivirus, polipéptidos de picorna virus (por ejemplo, un polipéptido de la cápside del poliovirus), polipéptidos del virus de la viruela (por ejemplo, un polipéptido de virus vacuna), polipéptidos del virus de la rabia (por ejemplo, una glicoproteína G del virus de la rabia), polipéptidos de reovirus, polipéptidos de retrovirus, y polipéptidos de rotavirus.

[115] En determinadas formas de realización, el antígeno puede ser un antígeno bacteriano. En determinadas formas de realización, un antígeno bacteriano de interés puede ser un polipéptido secretado. En otras ciertas formas de realización, los antígenos bacterianos incluyen antígenos que tienen un o más partes del polipéptido expuesto sobre la superficie celular externa de la bacteria.

[116] Los antígenos derivados de especies de *Staphylococcus* que incluyen a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) que se contemplan para usar incluyen a reguladores de la virulencia, tales como el sistema Agr, Sar y Sae, el sistema Arl, homólogos de Sar (Rot, MgrA, SarS, SarR, SarT, SarU, SarV, SarX, SarZ y TcaR), el sistema Srr y TRAP. Otras proteínas de *Staphylococcus* que pueden servir como antígenos incluyen a las proteínas Clp, HtrA, MsrR, aconitasa, CcpA, SvrA, Msa, CfvA y CfvB (véase, por ejemplo, *Staphylococcus: Molecular Genetics*, 2008 Caister Academic

Press, Ed. Jodi Lindsay). Los genomas de dos especies de *Staphylococcus aureus* (N315 y Mu50) se han secuenciado y están públicamente disponibles, por ejemplo en PATRIC (PATRIC: The VBI PathoSystems Resource Integration Center, Snyder y col., 2007). Como lo han de comprender las personas con experiencia en el arte, las proteínas de *Staphylococcus* para usar como antígenos también se pueden identificar en otras bases de datos públicas tales como GenBank®, Swiss-Prot®, y TrEMBL®.

[117] Los antígenos derivados de *Streptococcus pneumoniae* que se contemplan para usar en determinadas formas de realización descritas en la presente incluyen pneumolisina, PspA, proteína de unión a colina A (CbpA), proteínas NanA, NanB, SpnHL, PavA, LytA, Pht, y pilina (RrgA; RrgB; RrgC). Las proteínas antigénicas de *Streptococcus pneumoniae* también son conocidas en el arte y se pueden usar como antígenos en algunas formas de realización (véase, por ejemplo, Zysk y col., 2000). La secuencia genómica completa de una cepa virulenta de *Streptococcus pneumoniae* se ha secuenciado y, tal como lo comprenderán las personas con experiencia en el arte, las proteínas de *S. pneumoniae* para usar en la presente también se pueden identificar en otras bases de datos públicas tales como GENBANK®, SWISS-PROT®, y TREMBL®.

[118] Las proteínas de interés particular para los antígenos de acuerdo con la presente divulgación incluyen a factores de virulencia y proteínas predichas como expuestas en la superficie de los neumococos (véase, por ejemplo, Frolet y col., 2010).

[119] Los ejemplos de antígenos bacterianos que se pueden usar como antígenos incluyen, a título enunciativo no taxativo, polipéptidos de

Actinomyces, polipéptidos de *Bacillus*, polipéptidos de *Bacteroides*, polipéptidos de *Bordetella*, polipéptidos de *Bartonella*, polipéptidos de *Borrelia* (por ejemplo, *B. burgdorferi* OspA), polipéptidos de *Brucella*, polipéptidos de *Campylobacter*, polipéptidos de *Capnocytophaga*, polipéptidos de *Chlamydia*, polipéptidos de *Corynebacterium*, polipéptidos de *Coxiella*, polipéptidos de *Dermatophilus*, polipéptidos de *Enterococcus*, polipéptidos de *Ehrlichia*, polipéptidos de *Escherichia*, polipéptidos de *Francisella*, polipéptidos de *Fusobacterium*, polipéptidos de *Haemobartonella*, polipéptidos de *Haemophilus* (por ejemplo, proteína de membrana externa de tipo b de *H. influenzae*), polipéptidos de *Helicobacter*, polipéptidos de *Klebsiella*, polipéptidos de bacterias de forma L, polipéptidos de *Leptospira*, polipéptidos de *Listeria*, polipéptidos de *Mycobacteria*, polipéptidos de *Mycoplasma*, polipéptidos de *Neisseria*, polipéptidos de *Neorickettsia*, polipéptidos de *Nocardia*, polipéptidos de *Pasteurella*, polipéptidos de *Peptococcus*, polipéptidos de *Peptostreptococcus*, polipéptidos de *Pneumococcus* (es decir, polipéptidos de *S. pneumoniae*) (véase la descripción en la presente), polipéptidos de *Proteus*, polipéptidos de *Pseudomonas*, polipéptidos de *Rickettsia*, polipéptidos de *Rochalimaea*, polipéptidos de *Salmonella*, polipéptidos de *Shigella*, polipéptidos de *Staphylococcus*, polipéptidos de *Streptococcus* de grupo A (por ejemplo, proteínas M de *S. pyogenes*), polipéptidos de *streptococcus* de grupo B (*S. agalactiae*), polipéptidos de *Treponema*, y polipéptidos de *Yersinia* (por ejemplo, antígenos de *Y. pestis* F1 y V).

[120] Los ejemplos de antígenos fúngicos incluyen, a título enunciativo no taxativo, polipéptidos de *Absidia*, polipéptidos de *Acremonium*, polipéptidos de *Alternaria*, polipéptidos de *Aspergillus*, polipéptidos de *Basidiobolus*,

polipéptidos de *Bipolaris*, polipéptidos de *Blastomyces*, polipéptidos de *Candida*, polipéptidos de *Coccidioides*, polipéptidos de *Conidiobolus*, polipéptidos de *Cryptococcus*, polipéptidos de *Curvalaria*, polipéptidos de *Epidermophyton*, polipéptidos de *Exophiala*, polipéptidos de *Geotrichum*, polipéptidos de *Histoplasma*, polipéptidos de *Madurella*, polipéptidos de *Malassezia*, polipéptidos de *Microsporum*, polipéptidos de *Moniliella*, polipéptidos de *Mortierella*, polipéptidos de *Mucor*, polipéptidos de *Paecilomyces*, polipéptidos de *Penicillium*, polipéptidos de *Phialemonium*, polipéptidos de *Phialophora*, polipéptidos de *Prototheca*, polipéptidos de *Pseudallescheria*, polipéptidos de *Pseudomicrodochium*, polipéptidos de *Pythium*, polipéptidos de *Rhinosporidium*, polipéptidos de *Rhizopus*, polipéptidos de *Scolecobasidium*, polipéptidos de *Sporothrix*, polipéptidos de *Stemphylium*, polipéptidos de *Trichophyton*, polipéptidos de *Trichosporon* polipéptidos, y polipéptidos de *Xylohypha*.

[121] Los ejemplos de antígenos de parásitos protozoarios incluyen, a título enunciativo no taxativo, polipéptidos de *Babesia* , polipéptidos de *Balantidium* , polipéptidos de *Besnoitia*, polipéptidos de *Cryptosporidium*, polipéptidos de *Eimeria*, polipéptidos de *Encephalitozoon*, polipéptidos de *Entamoeba*, polipéptidos de *Giardia*, polipéptidos de *Hammondia*, polipéptidos de *Hepatozoon*, polipéptidos de *Isospora*, polipéptidos de *Leishmania*, polipéptidos de *Microsporidia*, polipéptidos de *Neospora*, polipéptidos de *Nosema*, polipéptidos de *Pentatrichomonas*, polipéptidos de *Plasmodium*. Los ejemplos de antígenos de parásitos helmínticos incluyen, a título enunciativo no taxativo, polipéptidos de *Acanthocheilonema*, polipéptidos de *Aelurostrongylus*, polipéptidos de *Ancylostoma*, polipéptidos de *Angiostrongylus*, polipéptidos de

Ascaris, polipéptidos de *Brugia*, polipéptidos de *Bunostomum*, polipéptidos de *Capillaria*, polipéptidos de *Chabertia*, polipéptidos de *Cooperia*, polipéptidos de *Crenosoma*, polipéptidos de *Dictyocaulus*, polipéptidos de *Diectophyme*, polipéptidos de *Dipetalonema*, polipéptidos de *Diphyllbothrium*, polipéptidos de *Diplydium*, polipéptidos de *Dirofilaria*, polipéptidos de *Dracunculus*, polipéptidos de *Enterobius*, polipéptidos de *Filaroides*, polipéptidos de *Haemonchus*, polipéptidos de *Lagochilascaris*, polipéptidos de *Loa*, polipéptidos de *Mansonella*, polipéptidos de *Muellerius*, polipéptidos de *Nanophyetus*, polipéptidos de *Necator*, polipéptidos de *Nematodirus*, polipéptidos de *Oesophagostomum*, polipéptidos de *Onchocerca*, polipéptidos de *Opisthorchis*, polipéptidos de *Ostertagia*, polipéptidos de *Parafilaria*, polipéptidos de *Paragonimus*, polipéptidos de *Parascaris*, polipéptidos de *Physaloptera*, polipéptidos de *Protostrongylus*, polipéptidos de *Setaria*, polipéptidos de *Spirocerca*, polipéptidos de *Spirometra*, polipéptidos de *Stephanofilaria*, polipéptidos de *Strongyloides*, polipéptidos de *Strongylus*, polipéptidos de *Thelazia*, polipéptidos de *Toxascaris*, polipéptidos de *Toxocara*, polipéptidos de *Trichinella*, polipéptidos de *Trichostrongylus*, polipéptidos de *Trichuris*, polipéptidos de *Uncinaria*, y polipéptidos de *Wuchereria* (por ejemplo, circun-esporozoíto de *P. falciparum* (PfCSP)), proteína de superficie de esporozoíto 2 (PfSSP2), carboxilo terminal del antígeno de estado hepático 1 (PfLSA1 c-term), y proteína exportada 1 (PfExp-1), polipéptidos de *Pneumocystis*, polipéptidos de *Sarcocystis*, polipéptidos de *Schistosoma*, polipéptidos de *Theileria*, polipéptidos de *Toxoplasma*, y polipéptidos de *Trypanosoma*.

[122] Los ejemplos de antígenos de ectoparásitos incluyen, a título enunciativo no taxativo, polipéptidos (incluyendo antígenos así como también alérgenos) de pulgas; garrapatas, incluyendo garrapatas de cuerpo duro y garrapatas de cuerpo blando; moscas, tales como jejenes, mosquitos, moscas de arena, moscas negras, tábanos, moscas de los cuernos, moscas de venado, moscas tse-tse, *Stomoxys calcitrans*, moscas causantes de miasis y chinches chupadoras; hormigas; arañas, piojos; ácaros; y hemípteros verdaderos, tales como insectos de las camas e triatominos.

III. Proteínas Opcionales

[123] En algunas formas de realización, se utilizan una o más proteínas adicionales con el CAR particular de la divulgación. La una o más proteínas adicionales pueden usarse por cualquier razón, incluyendo para facilitar la eficacia del CAR en sí mismo y/o para facilitar la eficacia de cualquier tipo de célula que exprese el CAR. En algunos casos, la proteína adicional facilita el tratamiento de un individuo que recibe las células que expresan el CAR como terapia, en donde la otra o las otras proteínas impactan o no directa o indirectamente en la actividad del CAR o las células. En algunos casos, la proteína adicional es un gen suicida, una o más citoquinas, o ambos. En formas de realización específicas, se producen una o más proteínas adicionales a partir de un vector y finalmente se obtienen como dos polipéptidos separados. Por ejemplo, el CAR y la o las proteínas adicionales pueden estar separadas por una secuencia 2A o por un IRES, por ejemplo.

[124] En formas de realización específicas, una o más citoquinas, tal como la IL-15, se usan en conjunto con el CAR.

[125] Secuencia de aminoácidos de IL-15:

ISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFI LGCFSAGLPKTEANWVNVISDLK
KIEDLIQSMHIDATLYTESDVHP SCKVTAMKCF LLELQVISLESGDASIHDTVEN
LIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKN IKEFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID
NO:8)

Cualquier polipéptido abarcado por la presente divulgación puede comprender la SEQ ID NO:8 o una secuencia que tiene por lo menos 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% o más de identidad a la SEQ ID NO:8.

[126] En formas de realización específicas, se usa un producto de gen suicida tal como la caspasa 9 (por ejemplo, caspasa inducible 9) en conjunto con el CAR.

[127] Ejemplo de secuencia de aminoácidos de caspasa 9:

MLEGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTG MLEDGKKVDSSRDRNKP FKF
MLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISP DYAYGATGHPGIIPPHATLVFDV
ELLKLESGGGSGVDGFGDVGAL ESLRGNADLAYILSMEPCGHCLINN VNF CR
ESGLRTRTGSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAQQDHG
ALDCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGT DGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGK
PKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDATPFQEGLRTFDQLD
AISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSL
LLRVANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTSAS (SEQ ID NO:9)

Cualquier polipéptido abarcado por la presente divulgación puede comprender la SEQ ID NO:9 o una secuencia que tiene por lo menos 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% o más de identidad con la SEQ ID NO:9.

[128] En los casos en los que el CAR y la proteína adicional en el mismo vector intentan producirse en dos polipéptidos diferentes, se puede utilizar una secuencia 2A específica.

[129] La secuencia de aminoácidos de E2A se puede utilizar de la siguiente manera:

QCTNYALLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO:10)

[130] Se pueden utilizar otros ejemplos de 2A que son de la siguiente manera:

[131] T2A: EGRGSLTCTGDVEENPGP (SEQ ID NO:11)

[132] P2A: ATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO:12)

[133] F2A: VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO:13)

[134] La divulgación también abarca moléculas CAR específicas, incluyendo para la expresión en cualquier tipo de célula efectora inmunológica.

[135] En un vector, el CAR se puede expresar con la IL-15, tal como separada del CAR por una secuencia 2A.

A. Citoquinas

[136] Se pueden usar una o más citoquinas con el uno o más receptores genéticamente modificados divulgados, tal como CAR que comprenden (a) opcionalmente una bisagra; y (b1) un dominio transmembrana de CD28, o (b2) un dominio transmembrana de DAP10; y (c) un dominio coestimulador de DAP10. En algunos casos, hay presentes una o más citoquinas en la misma molécula de vector que el receptor modificado, aunque en otros casos están en vectores separados. En formas de realización particulares, se coexpresan una o más citoquinas a partir del mismo vector que el receptor modificado. Se pueden producir una o más citoquinas en forma de polipéptido separado del receptor específico de antígeno. Por ejemplo, se usa la interleuquina-15 (IL-15). La IL-15 se puede emplear debido a que, por ejemplo, la misma tiene una restricción tisular y solo se la observa bajo condiciones patológicas a cualquier

nivel en el suero, o en forma sistémica. La IL-15 posee varios atributos que son deseables para la terapia adoptiva. La IL-15 es una citoquina homeostática que induce el desarrollo y la proliferación celular de las células asesinas naturales, promueve la erradicación de tumores establecidos mediante la disminución de la supresión funcional de las células residentes en tumor, e inhibe la muerte celular inducida por activación. Además de la IL-15, se prevén otras citoquinas. Estas incluyen, a título enunciativo no taxativo, citoquinas, quimoquinas, y otras moléculas que contribuyen a la activación y la proliferación de las células que se usan para aplicaciones en humanos. Por ejemplo, la una o más citoquinas son IL-15, IL-12, IL-2, IL-18, IL-21, IL-23, IL-7, o una combinación de las mismas. Pueden usarse células NK que expresen IL-15 y estas son capaces de producir una señalización de apoyo de citoquinas continua, lo cual es útil para su supervivencia después de la infusión.

[137] En formas de realización específicas, las células NK expresan una o más citoquinas exógenamente provistas. La citoquina se puede proveer en forma exógena a las células NK debido a que la misma es expresada a partir de un vector de expresión dentro de la célula y/o debido a que es provista en un medio de cultivo de las células. En un caso alternativo, se aumenta la expresión de una citoquina endógena en la célula mediante la manipulación de la regulación de la expresión de la citoquina endógena, tal como una recombinación genética en el o los sitios promotores de la citoquina. En los casos en los que la citoquina es provista a la célula mediante una construcción de expresión, la citoquina puede estar codificada en el mismo vector que el gen suicida. La citoquina se puede expresar como una molécula de polipéptido separado del gen suicida y como un polipéptido separado del receptor

modificado de la célula. En algunas formas de realización, la presente divulgación se relaciona con la utilización conjunta de vectores con CAR y/o TCR con IL-15, particularmente en células NK.

B. Genes suicidas

[138] En formas de realización particulares, se usa un gen suicida en conjunto con la terapia celular de cualquier tipo para controlar su uso y permitir la terminación de la terapia celular en un evento y/o momento deseado. El gen suicida se emplea en las células transducidas con el fin de inducir la muerte de las células transducidas cuando sea necesario. Las células direccionadas contra un antígeno de la presente divulgación que se han modificado para portar un vector abarcado por la divulgación pueden comprender uno o más genes suicidas. En algunas formas de realización, el término “gen suicida” como se usa en la presente se define como un gen que, ante la administración de un profármaco u otro agente, afecta la transición de un producto génico a un compuesto que mata su célula hospedadora. En otras formas de realización, un gen suicida codifica para un producto génico que, cuando se desea, es alcanzado por un agente (tal como un anticuerpo) que se direcciona contra el producto del gen suicida. A “producto de gen suicida” describe a una proteína o polipéptido codificado por un gen suicida.

[139] Los ejemplos de combinaciones de gen suicida/profármaco que se pueden usar son timidina quinasa de Herpes Simplex Virus (HSV-tk) y ganciclovir, aciclovir, o FIAU; oxidorreductasa y cicloheximida; citosina desaminasa y 5-fluorocitosina; timidina quinasa y timidilato quinasa (Tdk::Tmk) y AZT; y desoxicitidina quinasa y arabinósido de citosina. Se puede usar la purina nucleósido fosforilasa de *E. coli*, un denominado gen suicida que

convierte el profármaco 6-metilpurina desoxirribósido a la purina tóxica 6-metilpurina. Otros ejemplos de genes suicidas que se usan con terapia de profármacos son el gen de citosina desaminasa de *E. coli* y el gen de timidina quinasa de HSV.

[140] Los ejemplos de genes suicidas también incluyen a CD20, CD52, EGFRv3, o la caspasa 9 inducible. En una forma de realización, se puede usar una versión truncada de la variante de EGFR III (EGFRv3) como antígeno suicida que puede ser escindido por el Cetuximab. Otros genes suicidas conocidos en el arte que se pueden usar en la presente divulgación incluyen a Purina nucleósido fosforilasa (PNP), enzimas Citocromo p450 (CYP), Carboxipeptidasas (CP), Carboxilesterasa (CE), Nitrorreductasa (NTR), Guanina Ribosiltransferasa (XGRTP), enzimas Glicosidasas, Metionina- α,γ -liasa (MET), y Timidina fosforilasa (TP). En algunas formas de realización, se usa una caspasa 9 inducible (iC9). Un ejemplo de iC9 se describe en, por ejemplo, Yagyu S, y col. Mol Ther. 2015 Sep;23(9):1475-85, incorporado a modo de referencia a la presente en su totalidad.

[141] En formas de realización particulares, los vectores que codifican para el CAR, o cualquier vector en una célula NK abarcado en la presente, incluyen uno o más genes suicidas. El gen suicida puede estar o no en el mismo vector que el CAR. En los casos en los que el gen suicida está presente en el mismo vector que el CAR, el gen suicida y el CAR pueden estar separados por un elemento IRES o 2A, por ejemplo.

C. Otros Receptores

[142] En algunas formas de realización, las células que comprenden el CAR pueden expresar uno o más receptores adicionales, incluyendo otras

moléculas CAR que pueden comprender o no uno o más de los componentes abarcados por la presente, uno o más receptores de citoquina, uno o más receptores de quimoquina (por ejemplo, como modificaciones que aumentan el tráfico y la localización en los sitios tumorales, tales como CXCR1 y CXCR2 para aumentar el tráfico a los tumores que producen CXCL8), y/o uno o más TCR sintéticos. En los casos en los que el otro receptor se direcciona contra un antígeno, tal como un antígeno canceroso, el otro receptor puede direccionarse o no contra el mismo antígeno que el o los CAR de la divulgación.

IV. Vectores

[143] Los CAR que comprenden (a) una bisagra de CD28; y (b1) un dominio transmembrana de CD28, o (b2) un dominio transmembrana de DAP10; y (c) un dominio coestimulador de DAP10 pueden administrarse a las células del sistema inmunológico del receptor mediante cualquier vector adecuado, incluyendo un vector viral o un vector no viral. Los ejemplos de vectores virales incluyen por lo menos a vectores retrovirales, lentivirales, adenovirales, o vectores de virus adenoasociados. Los ejemplos de vectores no virales incluyen al menos plásmidos, transposones, lípidos, nanopartículas, etc.

[144] En los casos en los que la célula del sistema inmunológico se transduce con un vector que codifica para el receptor genéticamente modificado y también requiere la transducción de un gen o genes adicionales a la célula, tal como un gen suicida y/o citoquina y/o un producto génico terapéutico adicional, el receptor de direccionamiento a antígeno, el gen suicida, la citoquina, y el gen terapéutico opcional pueden estar comprendidos o no en el mismo vector. En algunos casos, el CAR, el gen suicida, la citoquina,

y el gen terapéutico opcional se expresan a partir de la misma molécula de vector, tal como la misma molécula de vector viral. En dichos casos, la expresión del CAR, el gen suicida, la citoquina, y el gen terapéutico adicional puede estar regulada o no por los mismos elementos reguladores. Cuando el CAR, el gen suicida, la citoquina, y el gen terapéutico opcional están en el mismo vector, estos pueden expresarse o no como polipéptidos separados. En los casos en los que estos se expresan como polipéptidos separados, los mismos pueden estar separados en el vector mediante un elemento 2A o un elemento IRES (o se pueden usar ambos tipos en el mismo vector una vez o más de una vez), por ejemplo.

A. Formas de Realización Generales

[145] Un experto en la materia estará bien equipado para construir un vector mediante las técnicas recombinantes estándares (véase, por ejemplo, Sambrook y col., 2001 y Ausubel y col., 1996, ambos incorporados a la presente a modo de referencia) para la expresión de los receptores de antígeno de la presente divulgación.

1. Elementos Reguladores

[146] Los casetes de expresión que se incluyen en los vectores útiles en la presente divulgación en particular contienen (en dirección 5' a 3') un promotor transcripcional eucariota ligado operativamente a una secuencia codificante de proteína, señales de corte y empalme que incluyen secuencias interpuestas, y una secuencia de terminación de la transcripción/de poliadenilación. Los promotores y los potenciadores que controlan la transcripción de los genes codificantes de proteínas en las células eucariotas pueden comprender múltiples elementos genéticos. La maquinaria celular es capaz de reunir e

integrar la información reguladora provista por cada elemento, permitiendo que diferentes genes evolucionan en forma diferente, con frecuencia en patrones complejos de regulación transcripcional. Un promotor usado en el contexto de la presente divulgación incluye promotores constitutivos, inducibles y específicos de tejido, por ejemplo. En los casos en los que el vector se usa para la generación de una terapia contra el cáncer, un promotor puede ser eficaz bajo condiciones de hipoxia.

2. Promotor/Potenciadores

[147] Las construcciones de expresión que se proveen en la presente comprenden un promotor para dirigir la expresión del receptor de antígeno y otros productos génicos del cistron. Un promotor en general comprende una secuencia que funciona para posicionar el sitio de inicio de la síntesis de ARN. El ejemplo mejor conocido de esto es la caja TATA, pero en algunos promotores que carecen de caja TATA, tales como, por ejemplo, el promotor del gen de la desoxinucleotidilo terminal transferasa de mamíferos y el promotor de los genes tardíos de SV40, un elemento discreto que está sobre el sitio de inicio ayuda a fijar el lugar de inicio. Otros elementos promotores regulan la frecuencia de inicio de la transcripción. Típicamente, estos se localizan en la región corriente arriba del sitio de inicio, a pesar de que se ha demostrado que varios promotores contienen también elementos funcionales corriente abajo del sitio de inicio. Para poner una secuencia codificante “bajo el control de” un promotor, se posiciona el extremo 5’ del sitio de inicio de la transcripción del marco de lectura transcripcional “corriente abajo” (es decir, del lado 3’) del promotor seleccionado. El promotor “corriente arriba” estimula la transcripción del ADN y promueve la expresión del ARN codificado.

[148] El espaciamiento entre los elementos promotores con frecuencia es flexible, de modo que se conserva la función del promotor cuando los elementos se invierten o se mueven relativamente entre sí. En el promotor de tk, por ejemplo, el espaciamiento entre los elementos promotores se puede incrementar a 50 pb antes de que la actividad comience a declinar. Dependiendo del promotor, parece que los elementos individuales pueden funcionar de manera cooperativa o bien en forma independiente para activar la transcripción. Un promotor puede usarse o no en conjunto con un “potenciador”, el cual se refiere a una secuencia reguladora de acción en cis que participa en la activación transcripcional de una secuencia de ácido nucleico.

[149] Un promotor puede ser uno naturalmente asociado con una secuencia de ácido nucleico, que se puede obtener por aislamiento de las secuencias no codificantes del lado 5' que se localizan corriente arriba del segmento codificante y/o exón. Dicho promotor puede denominarse “endógeno.” De forma similar, un potenciador puede ser uno naturalmente asociado con una secuencia de ácido nucleico, localizado corriente abajo o bien corriente arriba de esa secuencia. Como alternativa, se obtendrán ciertas ventajas mediante el posicionamiento del segmento de ácido nucleico codificante bajo el control de un promotor recombinante o heterólogo, lo cual se refiere a un promotor que no está normalmente asociado con una secuencia de ácido nucleico en su ambiente natural. Un potenciador recombinante o heterólogo también se refiere a un potenciador que normalmente no está asociado con una secuencia de ácido nucleico en su ambiente natural. Dichos promotores o potenciadores pueden incluir promotores o potenciadores de

otros genes, y promotores o potenciadores aislados de cualquier otro virus, o célula procariota o eucariota, y promotores o potenciadores de “origen no natural”, es decir, que contienen diferentes elementos de diferentes regiones de regulación transcripcional, y/o mutaciones que alteran la expresión. Por ejemplo, los promotores que se usan más comúnmente en la construcción de ADN recombinante incluyen los sistemas promotores de β -lactamasa (penicilinasa), lactosa y triptófano (trp). Además de producir las secuencias de ácido nucleico de promotores y potenciadores en forma sintética, las secuencias se pueden producir usando tecnología recombinante de clonado y/o amplificación de ácidos nucleicos, incluyendo PCR™, en conexión con las composiciones que se divulgan en la presente. Más aún, se contempla también el empleo de secuencias control que dirigen la transcripción y/o la expresión de secuencias dentro de organelas no nucleares tales como mitocondrias, cloroplastos, y similares.

[150] Naturalmente, será importante emplear un promotor y/o potenciador que dirija en forma eficaz la expresión del segmento de ADN en la organela, tipo celular, tejido, órgano u organismo elegido para la expresión. Las personas con experiencia en el arte de la biología molecular en general conocen el uso de promotores, potenciadores, y combinaciones de tipos celulares para la expresión de proteínas, (véase, por ejemplo Sambrook y col., 1989, incorporada por la presente a modo de referencia). Los promotores empleados pueden ser constitutivos, específicos de tejido, inducibles, y/o útiles bajo las condiciones apropiadas para dirigir la expresión de alto nivel del segmento de ADN introducido, de manera de ser ventajosos en la producción a gran escala

de proteínas y/o péptidos recombinantes. El promotor puede ser heterólogo o endógeno.

[151] Además, también se puede usar cualquier combinación de promotor/potenciador (según, por ejemplo, la Eukaryotic Promoter Data Base EPDB, accesible a través de internet en epd.isb-sib.ch/) para dirigir la expresión. El uso de un sistema de expresión citoplasmática T3, T7 o SP6 es otra forma de realización posible. Las células eucariotas pueden soportar la transcripción citoplasmática de ciertos promotores bacterianos si se provee la polimerasa bacteriana apropiada, ya sea como parte del complejo de administración o bien como una construcción de expresión genética adicional.

[152] Los ejemplos no limitantes de promotores incluyen promotores virales tempranos o tardíos, tales como, los promotores tempranos o tardíos de SV40, los promotores tempranos inmediatos de citomegalovirus (CMV), los promotores tempranos del Virus de Sarcoma de Rous (RSV); promotores de células eucariotas, tales como por ejemplo, el promotor de beta actina, el promotor de GADPH, el promotor de metalotioneína; y promotores de elementos de respuesta concatenados, tales como los promotores de elemento de respuesta de AMP cíclico (cre), el promotor de elemento de respuesta de suero (sre), el promotor de ésteres de forbol (TPA) y los promotores de elementos de respuesta (tre) cercanos a una caja TATA mínima. También es posible usar secuencias promotoras de la hormona de crecimiento humana (por ejemplo, el promotor mínimo de la hormona de crecimiento humana que se describe en GenBank®, No. de acceso X05244, nucleótidos 283-341) o un promotor de tumor mamario de ratón (disponible en ATCC, No. de Cat. ATCC 45007). En determinadas formas de realización, el promotor es el promotor de

IE de CMV, dectina-1, dectina-2, CD11c humano, F4/80, SM22, RSV, SV40, Ad MLP, beta-actina, MHC clase I o MHC clase II, sin embargo se puede aplicar cualquier otro promotor que sea útil para dirigir la expresión del gen terapéutico en la práctica de la presente divulgación.

[153] En ciertos aspectos, los métodos de la divulgación también incluyen secuencias potenciadoras, es decir, secuencias de ácido nucleico que incrementan la actividad de un promotor y que tienen el potencial de actuar en cis, e independientemente de su orientación, incluso a distancias relativamente grandes (hasta de varias kilobases desde el promotor diana). Sin embargo, la función del potenciador no necesariamente se restringe a dichas distancias largas ya que los mismos también pueden funcionar en forma próxima a un promotor dado.

3. Señales de Inicio y Expresión Coordinada

[154] También se puede usar una señal de inicio específica en las construcciones de expresión que se proveen en la presente divulgación para la traducción eficaz de las secuencias codificantes. Estas señales incluyen el codón de inicio ATG o secuencias adyacentes. Puede necesitarse la provisión de señales exógenas para el control de la traducción, incluyendo el codón de inicio ATG. Las personas con experiencia en el arte serán capaces de determinar esto y de proveer las señales necesarias fácilmente. Es bien sabido que el codón de inicio debe estar “en marco” con el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para asegurar la traducción del inserto completo. Las señales exógenas de control de la traducción y los codones de inicio pueden ser naturales o bien sintéticos. La eficacia de expresión puede

aumentarse mediante la inclusión de elementos potenciadores apropiados de la transcripción.

[155] En determinadas formas de realización, se usan elementos internos de sitio de entrada a ribosoma (IRES) para crear mensajes multigénicos, o policistrónicos. Los elementos IRES son capaces de evitar el modelo de escaneo ribosómico de la traducción dependiente de Cap metilada en 5' y comenzar la traducción en sitios internos. Se han descrito los elementos IRES de dos miembros de la familia picornavirus (polio y encefalomiocarditis), así como también un IRES de un mensajero de mamíferos. Los elementos IRES pueden conectarse a marcos de lectura abiertos heterólogos. Se pueden transcribir múltiples marcos abiertos de lectura juntos, cada uno separado por un IRES, creando mensajeros policistrónicos. En virtud del elemento IRES, cada marco abierto de lectura es accesible a los ribosomas para su eficaz traducción. Se pueden expresar en forma eficaz múltiples genes usando un promotor/potenciador individual para transcribir un mensajero individual.

[156] Como se describe en otros lugares de la presente, se pueden usar ciertos elementos de secuencia 2A para crear la coexpresión o la expresión conjunta de genes en las construcciones que se proveen en la presente divulgación. Por ejemplo, se pueden usar secuencias de escisión para coexpresar genes mediante la conexión de los marcos abiertos de lectura para formar un cistrón único. Un ejemplo de secuencia de escisión es la secuencia de virus de rinitis equina A (E2A) o F2A (virus de la enfermedad de pies y boca 2A) o una secuencia "similar a 2A" (por ejemplo, virus *Thosea asigna* 2A; T2A) o teschovirus pocрино-1 (P2A). En formas de realización específicas, en un único vector las múltiples secuencias 2A no son idénticas, aunque en formas

de realización alternativas el mismo vector usa dos o más unidades de la misma secuencia 2A. Los ejemplos de secuencias 2A se proveen en US 2011/0065779 que se incorpora a modo de referencia a la presente en su totalidad.

4. Orígenes de Replicación

[157] Con el objetivo de propagar un vector en una célula huésped, el mismo puede contener uno o más sitios de origen de replicación (con frecuencia llamados “ori”), por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que corresponde al oriP del EBV como se describió anteriormente o un oriP genéticamente modificado con una función similar o aumentada en la programación, el cual es una secuencia de ácido nucleico específica en la cual se inicia la replicación. Como alternativa, se puede emplear un origen de replicación de otro virus de replicación extracromosómica como se describió anteriormente o una secuencia de replicación autónoma (ARS).

5. Marcadores de Selección Y Cribado

[158] En algunas formas de realización, las células NK que comprenden una construcción de receptor de la presente divulgación se pueden identificar *in vitro* o *in vivo* mediante la inclusión de un marcador en el vector de expresión. Dichos marcadores conferirán un cambio identificable a la célula que permite una fácil identificación de las células que contienen el vector de expresión. En general, un marcador de selección es uno que confiere una propiedad que permite la selección. Un marcador de selección positiva es uno en donde la presencia del marcador permite su selección, mientras que un marcador de selección negativa es uno en donde su presencia evita su selección. Un

ejemplo de un marcador de selección positiva es un marcador de resistencia a un fármaco.

[159] Usualmente la inclusión de un marcador de selección por fármaco ayuda al clonado y la identificación de los transformantes, por ejemplo, los genes que confieren resistencia a neomicina, puromicina, higromicina, DHFR, GPT, zeocina e histidinol son marcadores de selección útiles. Además de los marcadores que confieren un fenotipo que permite la discriminación de los transformantes en base a la implementación de condiciones, también se contempla la inclusión de otros tipos de marcadores que incluyen marcadores de cribado tales como GFP, cuya base es un análisis colorimétrico. Como alternativa, se pueden utilizar enzimas de cribado como marcadores de selección negativa tales como la timidina quinasa (*tk*) o la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) del virus herpes simplex. Las personas con experiencia en el arte también sabrán cómo emplear marcadores inmunológicos, posiblemente en conjunto con análisis por FACS. Se cree que el marcador usado no es importante, siempre y cuando sea capaz de expresarse en forma simultánea con el ácido nucleico que codifica para un producto génico. Otros ejemplos de marcadores de selección y cribado son bien conocidos para las personas con experiencia en el arte.

B. Vectores Multicistronicos

[160] En formas de realización particulares, un vector que codifica para el receptor genéticamente modificado que comprende (a) bisagra de CD28, (b1) dominio transmembrana de CD28 o (b2) dominio transmembrana de DAP10, y (c) dominio coestimulador de DAP10, también comprende una secuencia que codifica para un gen suicida opcional, citoquina opcional, y/o gen terapéutico

opcional, incluyendo la expresión a partir de un vector multicistrónico (El término “cistrón” como se usa en la presente se refiere a una secuencia de ácido nucleico a partir de la que se puede producir un producto génico). En formas de realización específicas, el vector multicistrónico codifica para el receptor, el gen suicida, y por lo menos una citoquina, y/o receptor modificado, tal como un receptor de células T y/o un CAR adicional. En algunos casos, el vector multicistrónico codifica para por lo menos un CAR, por lo menos un mutante no secretable de TNF-alfa, y por lo menos una citoquina. La citoquina puede ser de un tipo particular de citoquina, tal como de humano o ratón o de cualquier especie. En casos específicos, la citoquina es IL15, IL12, IL2, IL18 y/o IL21.

[161] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un sistema modular flexible (el término “modular” como se usa en la presente se refiere a un cistrón o componente de un cistrón que permite el intercambio del mismo, tal como por eliminación o reemplazo de un cistrón entero o de un componente de un cistrón, respectivamente, por ejemplo mediante el uso de técnicas de recombinación estándares) que utiliza un vector policistrónico que tiene la capacidad de expresar múltiples cistrones a niveles sustancialmente idénticos. El sistema se puede usar para la modificación de células que permite una expresión combinatoria (incluyendo la sobreexpresión) de múltiples genes. En formas de realización específicas, uno o más de los genes expresados por el vector incluyen uno, dos, o más receptores de antígeno. Los múltiples genes pueden comprender, a título enunciativo no taxativo, CAR, TCR, citoquinas, quimoquinas, receptores de alojamiento, mutaciones génicas mediadas por CRISPR/Cas9, receptores señuelo,

receptores de citoquina, receptores quiméricos de citoquina, etc. El vector además puede comprender: (1) uno o más reporteros, por ejemplo reporteros fluorescentes o enzimáticos, tales como para ensayos celulares y adquisición de imágenes en animales; (2) una o más citoquinas u otras moléculas de señalización; y/o (3) un gen suicida.

[162] En casos específicos, el vector puede comprender por lo menos 4 cistrones separados por sitios de escisión de cualquier tipo, tales como sitios de escisión 2A. El vector puede o no estar basado en el Virus de Leucemia Murina de Moloney (MoMLV o MMLV) incluyendo la LTR 3' y 5' con la secuencia de empaquetamiento psi en un esqueleto pUC19. El vector puede comprender 4 o más cistrones con tres o más sitios de escisión 2A y múltiples ORF para intercambio génico. El sistema permite la sobreexpresión combinatoria de múltiples genes (7 o más) que están flanqueados por uno o más sitios de restricción para una rápida integración mediante subclonado, y el sistema también incluye por lo menos tres sitios de autoescisión 2A, en algunas formas de realización. Por lo tanto, el sistema permite la expresión de múltiples CAR, TCR, moléculas de señalización, citoquinas, receptores de citoquina y/o receptores de alojamiento. Este sistema también se puede aplicar a otros vectores virales y no virales, incluyendo, a título enunciativo no taxativo, lentivirus, AAV adenovirales, así como también plásmidos no virales.

[163] La naturaleza modular del sistema también permite el subclonado eficaz de un gen en cada uno de los 4 cistrones del vector policistrónico de expresión y el intercambio de genes, tal como para una prueba rápida. Los sitios de restricción estratégicamente localizados en el vector policistrónico de expresión permiten el intercambio de genes con eficacia.

[164] Ciertas formas de realización de la divulgación abarcan sistemas que utilizan un vector policistrónico en donde por lo menos parte del vector es modular, por ejemplo permitiendo la remoción y reemplazo de uno o más cistrones (o uno o más componentes de uno o más cistrones), tal como mediante la utilización de uno o más sitios de enzimas de restricción cuya identidad y ubicación se seleccionan de manera específica para facilitar el uso modular del vector. El vector también tiene formas de realización en donde se traducen múltiples cistrones a un polipéptido único y se procesan en polipéptidos separados, impartiendo así una ventaja para el vector para expresar productos génicos separados en concentraciones sustancialmente equimolares.

[165] El vector de la divulgación se configura para ser capaz de cambiar en forma modular uno o más cistrones del vector y/o cambiar uno o más componentes de uno o más cistrones particulares. El vector puede diseñarse para utilizar sitios únicos de enzima de restricción que flanquean los extremos de uno o más cistrones y/o flanquean los extremos de uno o más componentes de un cistrón particular.

[166] Algunas formas de realización de la divulgación incluyen vectores policistrónicos que comprenden por lo menos dos, por lo menos tres, o por lo menos cuatro cistrones cada uno flanqueado por uno o más sitios de enzima de restricción, en donde por lo menos un cistrón codifica para por lo menos un receptor de antígeno. En algunos casos, se traducen dos, tres, cuatro o más de los cistrones a un polipéptido único y se escinden a polipéptidos separados, mientras que en otros casos se traducen múltiples cistrones a un polipéptido único y se escinden a polipéptidos separados. Los cistrones adyacentes del

vector se pueden separar mediante un sitio de autoescisión, tal como un sitio de autoescisión 2A. En algunos casos cada uno de los cistrones expresa polipéptidos separados a partir del vector. En casos particulares, los cistrones adyacentes del vector están separados por un elemento IRES.

[167] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un sistema de modificación celular que permite una expresión combinatoria, incluyendo la sobreexpresión, de múltiples cistrones que pueden incluir uno, dos, o más receptores de antígeno, por ejemplo. En formas de realización particulares, el uso de un vector policistrónico como se describe en la presente permite que el vector produzca niveles equimolares de múltiples productos génicos a partir del mismo ARNm. Los múltiples genes pueden comprender, a título enunciativo no taxativo, CAR, TCR, citoquinas, quimoquinas, receptores de alojamiento, mutaciones génicas mediadas por CRISPR/Cas9, reporteros señuelo, receptores de citoquina, receptores quiméricos de citoquina, etc. El vector además puede comprender uno o más reporteros fluorescentes o enzimáticos, tales como para ensayos celulares y adquisición de imágenes en animales. El vector también puede comprender un producto de gen suicida para la muerte de las células que portan el vector cuando las mismas ya no son necesarias o se vuelven deletéreas para un hospedador al que se han provisto.

[168] En formas de realización específicas, el vector es un vector viral (vector retroviral, vector lentiviral, vector adenoviral, o vector viral adenoasociado, por ejemplo) o un vector no viral. El vector puede comprender un Virus de Leucemia Murina de Moloney (MMLV) 5' LTR, 3' LTR, y/o elemento de empaquetamiento psi. En casos específicos, el empaquetamiento psi se

incorpora entre la 5' LTR y la secuencia que codifica para el receptor de antígeno. El vector puede comprender o no una secuencia pUC19. En algunos aspectos del vector, por lo menos un cistron codifica para una citoquina (IL-15, IL-7, IL-21, IL-23, IL-18, IL-12, o IL-2, por ejemplo), quimoquina, receptor de citoquina, y/o receptor de alojamiento.

[169] Cuando se utilizan sitios de escisión 2A en el vector, el sitio de escisión 2A puede comprender un sitio P2A, T2A, E2A y/o F2A.

[170] Un sitio para enzima de restricción puede ser de cualquier tipo y puede incluir cualquier número de bases en su sitio de reconocimiento, tal como entre 4 y 8 bases; el número de bases en el sitio de reconocimiento puede ser de por lo menos 4, 5, 6, 7, 8 o más. El sitio, al cortarse, puede producir un corte romo o extremos pegajosos. La enzima de restricción puede ser de Tipo I, Tipo II, Tipo III o Tipo IV, por ejemplo. Los sitios para enzima de restricción se pueden obtener a partir de bases de datos disponibles, tales como la base de datos Integrated Relational Enzyme (IntEnz) o BRENDA (The Comprehensive Enzyme Information System).

[171] Los ejemplos de vectores pueden ser circulares y por convención, la posición 1 (posición de las 12 horas en la parte superior del círculo, con el resto de la secuencia en dirección horaria) se configura en el inicio de la 5' LTR.

[172] En formas de realización en donde se utilizan péptidos de autoescisión 2A, los péptidos 2A pueden ser oligopéptidos virales de entre 18 y 22 aminoácidos de longitud que median la “escisión” de los polipéptidos durante la traducción en las células eucariotas. La designación de “2A” se refiere a una región específica del genoma viral y los diferentes 2A virales en general se han nombrado en base al virus del que derivan. La primera 2A

descubierta fue la F2A (virus de la enfermedad de pies y boca), después de la cual también se identificó a E2A (virus de rinitis equina A), P2A (2A de teschovirus porcino -1), y T2A (2A de virus thosa asigna). Se descubrió que el mecanismo de la “autoescisión” mediada por 2A es un salteo ribosómico en la formación del enlace peptídico glicil-prolilo en el extremo C terminal de la 2A.

[173] En casos específicos, el vector puede ser un vector de transferencia retroviral y. El vector de transferencia retroviral puede comprender un esqueleto basado en un plásmido, tal como el plásmido pUC19 (fragmento grande (2,63kb) entre los sitios de enzima de restricción HindIII y EcoRI). El esqueleto puede portar componentes virales del Virus de la Leucemia Murina de Moloney (MoMLV) incluyendo la 5' LTR, la secuencia de empaquetamiento psi, y la 3' LTR. Las LTR son repeticiones terminales largas que se hallan a cada lado de un provirus retroviral, y en el caso de un vector de transferencia, encierran la carga genética de interés, tal como los CAR que comprenden (a) bisagra de CD28, (b1) dominio transmembrana de CD28 o (b2) dominio transmembrana de DAP10, y (c) dominio coestimulador de DAP10 y opcionalmente componentes asociados. La secuencia de empaquetamiento psi, que es el sitio diana para el empaquetamiento mediante la nucleocápside, también está incorporada en *cis*, entre la 5' LTR y la secuencia que codifica para el CAR. Por lo tanto, la estructura básica de un ejemplo de un vector de transferencia se puede configurar de la siguiente manera: secuencia pUC19 – 5' LTR – secuencia de empaquetamiento psi– carga genética de interés – 3' LTR – secuencia pUC19. Este sistema también se puede aplicar a otros vectores virales y no virales, incluyendo, a título enunciativo no taxativo, lentivirus, adenovirus AAV, así como también plásmidos no virales.

V. Células

[174] La presente divulgación abarca células del sistema inmunológico o células madre de cualquier tipo que portan por lo menos un vector que codifica para el receptor genéticamente modificado que comprende (a) bisagra de CD28, (b1) dominio transmembrana de CD28 o (b2) dominio transmembrana de DAP10, y (c) dominio coestimulador de DAP10 y que también puede codificar para por lo menos una citoquina y/o por lo menos un gen suicida. En algunos casos, diferentes vectores codifican para el CAR y codifican para el gen suicida y/o la citoquina. Las células del sistema inmunológico, incluyendo las células NK, pueden obtenerse de sangre de cordón (incluyendo sangre de cordón combinada de múltiples fuentes), sangre periférica, células madre pluripotentes inducidas (iPSC), células madre hematopoyéticas (HSC), de médula ósea, o una mezcla de las mismas. Las células NK pueden derivar de una línea celular tal como, a título enunciativo no taxativo, las células NK-92, por ejemplo. La célula NK puede ser una célula mononuclear de sangre de cordón, tal como una célula NK CD56+.

[175] La presente divulgación abarca células del sistema inmunológico u otras células de cualquier tipo, incluyendo células T convencionales, células T gamma-delta, NKT y células T NK invariantes, células T reguladoras, macrófagos, células B, células dendríticas, células del estroma mesenquimatoso (MSC), o una mezcla de las mismas.

[176] En algunos casos, las células se han expandido en presencia de una cantidad eficaz de células presentadoras de antígeno universales (UAPC), en cualquier proporción. Las células se pueden cultivar con las UAPC a una proporción de entre 10:1 y 1:10; entre 9:1 y 1:9; entre 8:1 y 1:8; entre 7:1 y 1:7;

entre 6:1 y 1:6; entre 5:1 y 1:5; entre 4:1 y 1:4; entre 3:1 y 1:3; entre 2:1 y 1:2; o 1:1, incluyendo una proporción de 1:2, por ejemplo. En algunos casos, las células NK se expandieron en presencia de IL-2, tal como a una concentración de entre 10 y 500, entre 10 y 400, entre 10 y 300, entre 10 y 200, entre 10 y 100, entre 10 y 50, entre 100 y 500, entre 100 y 400, entre 100 y 300, entre 100 y 200, entre 200 y 500, entre 200 y 400, entre 200 y 300, entre 300 y 500, entre 300 y 400, o entre 400 y 500 U/mL.

[177] Después de la modificación genética con el o los vectores, las células NK se pueden infundir inmediatamente o se pueden almacenar. En ciertos aspectos, después de la modificación genética, las células se pueden propagar durante días, semanas, o meses *ex vivo* como población a granel en aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5 días o más después de la transferencia génica a las células. En un aspecto adicional, los transfectantes se clonan y un clon que muestra la presencia de un casete o plásmido de expresión mantenido en forma episómica o integrado en forma individual, y la expresión del CAR, se expande *ex vivo*. El clon seleccionado para su expansión demuestra la capacidad de reconocer de manera específica y lisar las células diana que expresan antígeno. Las células recombinantes del sistema inmunológico se pueden expandir por estimulación con IL-2, u otras citoquinas que se unen a la cadena gamma común (por ejemplo, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-23, y otras). Las células recombinantes del sistema inmunológico se pueden expandir por estimulación con células presentadoras de antígeno artificiales. En un aspecto adicional, las células genéticamente modificadas se pueden crioconservar.

[178] Algunas formas de realización de la divulgación abarcan células que expresan uno o más CAR y uno o más genes suicidas como se provee en la presente. La célula NK comprende un ácido nucleico recombinante que codifica para uno o más CAR y uno o más polipéptidos mutantes de TNF-alfa no secretables modificados, unidos a membrana, en formas de realización específicas. En formas de realización específicas, además de expresar uno o más CAR y polipéptidos mutantes de TNF-alfa, la célula también comprende un ácido nucleico que codifica para uno o más productos génicos terapéuticos.

[179] Las células se pueden obtener de un individuo directamente o se pueden obtener a partir de un repositorio o centro de almacenamiento. Las células para la terapia pueden ser autólogas o alogénicas con respecto al individuo al que se proveen las células en forma de terapia.

[180] Las células pueden ser de un individuo que necesita una terapia para una condición médica, y luego de su manipulación para que expresen el CAR, un gen suicida opcional, una o más citoquinas opcionales, y uno o más productos génicos terapéuticos opcionales (usando técnicas estándares de transducción y expansión para terapia celular adoptiva, por ejemplo), se pueden restituir nuevamente al individuo del que se tomaron originalmente. En algunos casos, las células se almacenan para el uso posterior en el individuo u otro individuo.

[181] Las células del sistema inmunológico pueden estar comprendidas en una población de células, y esa población puede tener una mayoría que están transducidas con uno o más receptores y/o uno o más genes suicidas y/o una o más citoquinas. Una población celular puede comprender 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76,

77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100% de células del sistema inmunológico que están transducidas con uno o más CAR y/o uno o más genes suicidas y/o una o más citoquinas. El uno o más CAR y/o el uno o más genes suicidas y/o la una o más citoquinas pueden ser polipéptidos separados.

[182] Las células del sistema inmunológico se pueden producir con el uno o más CAR y/o uno o más genes suicidas y/o una o más citoquinas para ser modular con respecto a un propósito específico. Por ejemplo, se pueden generar células, incluyendo para su distribución comercial, que expresan un CAR y/o uno o más genes suicidas y/o una o más citoquinas (o distribuidos como un ácido nucleico que codifica para el mutante para su subsiguiente transducción), y un usuario las puede modificar para expresar uno o más de otros genes de interés (incluyendo genes terapéuticos) dependiendo de su uso pretendido. Por ejemplo, un individuo interesado en tratar células positivas para un antígeno, incluyendo células de cáncer o infectadas con agente infeccioso que son positivas para un antígeno, puede obtener o generar células que expresan el gen suicida (o células que expresan citoquinas heterólogas) y modificarlas para expresar un receptor que comprende un scFv específico de antígeno, o viceversa.

[183] En formas de realización particulares, se utilizan células NK, y el genoma de las células NK transducidas que expresan el uno o más CAR y/o uno o más genes suicidas y/o una o más citoquinas, se puede modificar. El genoma se puede modificar de cualquier manera, pero en formas de realización específicas el genoma se modifica por edición génica con CRISPR,

por ejemplo. El genoma de las células se puede modificar para aumentar la eficacia de las células para cualquier propósito.

VI. Métodos de Tratamiento

[184] En diversas formas de realización, se usan como dianas células enfermas u otras células que expresan un antígeno deseado en su superficie con el propósito de mejorar una condición médica en un individuo que tiene la condición médica o con el fin de reducir el riesgo o retrasar la severidad y/u el inicio de la condición médica en un individuo. En casos específicos, se usan como dianas células cancerígenas que expresan el antígeno endógeno con el propósito de matar las células cancerígenas. En otros casos, se usan como dianas células infectadas con un agente infeccioso con el propósito de matar las células infectadas.

[185] En formas de realización particulares, las construcciones de CAR, secuencias de ácido nucleico, vectores, células del sistema inmunológico etc., como se contempla en la presente, y/o composiciones farmacéuticas que los comprenden, se usan para la prevención, tratamiento o mejora de una enfermedad, tal como una enfermedad cancerosa. En formas de realización particulares, la composición farmacéutica de la presente divulgación puede ser particularmente útil para prevenir, mejorar y/o tratar el cáncer, incluyendo cánceres que expresan un antígeno particular y que pueden ser o no tumores sólidos, por ejemplo.

[186] Las células del sistema inmunológico para las que se utiliza el receptor pueden ser células NK, células T, células T gamma delta, células T alfa beta, o NKT o NKT invariantes (iNKT), o células NKT invariantes modificadas para terapia celular en mamíferos, en formas de realización

particulares. En dichos casos en que las células son células NK, la terapia con células NK puede ser de cualquier tipo y las células NK pueden ser de cualquier tipo. En formas de realización específicas, las células son células NK que se han modificado para expresar uno o más CAR y/o uno o más genes suicidas y/o una o más citoquinas. En formas de realización específicas, las células son células NK que se transducen con un CAR.

[187] En formas de realización particulares, la presente divulgación contempla, en parte, células que expresan CAR, construcciones de CAR, moléculas de ácido nucleico de CAR y vectores de CAR que se pueden administrar solos o en cualquier combinación usando vectores y/o sistemas de administración génica estándares, y en por lo menos algunos aspectos, junto con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En determinadas formas de realización, luego de la administración, las moléculas de ácido nucleico o vectores se pueden integrar en forma estable en el genoma del sujeto.

[188] En formas de realización específicas, se pueden usar vectores virales que son específicos para ciertas células o tejidos y que persisten en las células NK. Los vehículos y excipientes farmacéuticos adecuados son bien conocidos en el arte. Las composiciones preparadas de acuerdo con la divulgación se pueden usar para la prevención o el tratamiento o el retraso de las enfermedades anteriormente identificadas.

[189] Más aún, la divulgación se relaciona con un método para la prevención, tratamiento o menora de una enfermedad tumoral que comprende el paso de administrar a un sujeto que lo necesite, una cantidad eficaz de células que expresan un CAR, una secuencia de ácido nucleico, un vector,

como se contempla en la presente y/o producidos mediante un proceso como se contempla en la presente.

[190] Las posibles indicaciones para la administración de la o las composiciones de las células con CAR ejemplificativas son enfermedades cancerosas, incluyendo enfermedades tumorales, incluyendo malignidades de células B, mieloma múltiple, cáncer de mama, glioblastoma, cáncer renal, cáncer pancreático, o cáncer de pulmón, por ejemplo. Los ejemplos de indicaciones para la administración de la o las composiciones de células CAR direccionadas a antígenos son enfermedades cancerosas, incluyendo malignidades que expresan el antígeno. La administración de la o las composiciones de la divulgación es útil para todas las etapas (I, II, III o IV) y tipos de cáncer, incluyendo la enfermedad residual mínima, cáncer temprano, cáncer avanzado y/o cáncer metastásico y/o cáncer refractario, por ejemplo.

[191] La divulgación además abarca protocolos de coadministración con otros compuestos, por ejemplo construcciones de anticuerpos biespecíficos, toxinas dirigidas u otros compuestos, que actúan a través de las células del sistema inmunológico. El régimen clínico para la coadministración del o de los compuestos de la invención puede abarcar la coadministración al mismo momento, antes o después de la administración del otro componente. Las terapias combinadas particulares incluyen quimioterapia, radiación, cirugía, terapia con hormonas, u otros tipos de inmunoterapia.

[192] Algunas formas de realización se relacionan con un kit que comprende una construcción de CAR como se define en la presente, o los componentes abarcados por la presente, una secuencia de ácido nucleico como se define en la presente, un vector como se define en la presente y/o una

célula huésped (tal como una célula inmunológica) como se define en la presente. En formas de realización específicas, el kit comprende ácidos nucleicos que codifican para (a) bisagra de CD28, (b1) dominio transmembrana de CD28 o (b2) dominio transmembrana de DAP10, y/o (c) dominio coestimulador de DAP10, o cebadores adecuados para amplificar los mismos. También está contemplado que el kit de esta divulgación comprenda una composición farmacéutica como se describió anteriormente en la presente, sola o en combinación con otros medicamentos a ser administrados a un individuo en necesidad de tratamiento o intervención médica.

VII. Composiciones Farmacéuticas

[193] Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación comprenden una cantidad eficaz de composiciones que comprenden células NK dispersadas en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las expresiones "farmacéutica o farmacológicamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y composiciones que no producen ninguna reacción adversa, alérgica o indeseada cuando se administran a un animal, tal como, por ejemplo, un humano, según corresponda. La preparación de una composición farmacéutica que comprende las composiciones será conocida para los expertos en la materia a la luz de la presente divulgación, como se ejemplifica en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21ra Ed. Lippincott Williams y Wilkins, 2005, incorporado a la presente a modo de referencia. Más aún, para la administración a animales (por ejemplo, humanos), se entenderá que las preparaciones deben cumplir con los estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza requeridos por la Oficina de Estándares Biológicos de la FDA.

[194] Como se usa en la presente, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardantes de absorción, sales, conservantes, fármacos, estabilizantes de fármacos, geles, aglutinantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, colorantes, tales como materiales y combinaciones de los mismos, tal como será reconocido por un experto en el arte (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18va Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329, que se incorpora a la presente a modo de referencia). Excepto en la medida que cualquier vehículo convencional sea incompatible con el ingrediente activo, su uso está contemplado en las composiciones farmacéuticas.

[195] Las composiciones farmacéuticas pueden comprender diferentes tipos de vehículos dependiendo de si es para administrar en forma sólida, líquida o aerosol, y de si requiere ser estéril para dichas rutas de administración como para inyección. Las composiciones que se describen en la presente se pueden administrar por vía intravenosa, intradérmica, transdérmica, intratecal, intraarterial, intraperitoneal, intranasal, intravaginal, intrarrectal, tópica, intramuscular, subcutánea, mucosa, oral, tópica, local, inhalación (por ejemplo, inhalación de aerosol), inyección, infusión, infusión continua, perfusión localizada bañando células diana directamente, mediante un catéter, mediante un lavado, en cremas, en composiciones lipídicas (por ejemplo, liposomas), o mediante otro método o cualquier combinación de los precedentes tal como lo reconocerá cualquier experto en el arte (véase, por ejemplo, Remington's

Pharmaceutical Sciences, 18va Ed. Mack Printing Company, 1990, que se incorpora a la presente a modo de referencia).

[196] Las composiciones que comprenden las células NK se pueden formular en una composición en una forma de base libre, neutra o sal. Las sales farmacéuticamente aceptable, cuando resultan apropiadas incluyen las sales de adición ácidas, por ejemplo, aquellas formadas con los grupos aminos libres de una composición proteinácea, o las cuales están formadas con ácidos inorgánicos tales como por ejemplo, ácido clorhídrico o fosfórico, o tales como ácidos orgánicos como ácido acético, oxálico, tartárico o mandélico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivar de bases inorgánicas tales como por ejemplo, hidróxido de sodio, de potasio, de amonio, de calcio o férrico; o tales como bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaína. Con la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y con una cantidad tal que sea eficaz terapéuticamente. Las formulaciones se administran fácilmente mediante una variedad de formas de dosificación tales como formuladas para administraciones parenterales tales como soluciones inyectables, o aerosoles para la administración a los pulmones, o formuladas para administraciones alimenticias tales como cápsulas de liberación de fármaco y similares.

[197] Además de acuerdo con la presente divulgación, las composiciones de la presente divulgación adecuadas para la administración se proveen en un vehículo farmacéuticamente aceptable con o sin un diluyente inerte. El vehículo debe ser asimilable e incluye vehículos líquidos, semisólidos, es decir, pastas, o vehículos sólidos. Excepto en la medida que cualquier medio convencional,

agente, diluyente o vehículo sea perjudicial para el receptor o para la eficacia terapéutica de una composición contenida en el mismo, su uso en una composición para administración para usar en la práctica de los métodos de la presente invención es apropiado. Los ejemplos de vehículos o diluyentes incluyen grasas, aceites, agua, soluciones salinas, lípidos, liposomas, resinas, aglutinantes, rellenos y similares, o combinaciones de los mismos. La composición también puede comprender diferentes antioxidantes para retrasar la oxidación de uno o más componentes. Además, la prevención de la acción de los microorganismos se puede realizar mediante conservantes tales como diferentes agentes antibacterianos y antifúngicos, que incluyen a título enunciativo no taxativo a parabenos (por ejemplo, metilparabenos, propilparabenos), clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal o combinaciones de los mismos.

[198] De acuerdo con la presente divulgación, la composición se combina con el vehículo de cualquier manera conveniente y práctica, es decir, mediante solución, suspensión, emulsificación, mezcla, encapsulación, absorción y similares. Dichos procedimientos son de rutina para aquellos expertos en el arte.

[199] En una forma de realización específica de la presente divulgación, la composición se combina o se mezcla exhaustivamente con un vehículo semisólido o sólido. El mezclado se puede realizar de cualquier manera conveniente tal como por molido. Los agentes estabilizantes también se pueden agregar en el proceso de mezclado con el objetivo de proteger la composición de la pérdida de la actividad terapéutica, es decir, desnaturalización en el estómago. Los ejemplos de estabilizantes para usar en

la composición incluyen soluciones amortiguadoras, aminoácidos tales como glicina y lisina, hidratos de carbono tales como dextrosa, manosa, galactosa, fructosa, lactosa, sacarosa, maltosa, sorbitol, manitol, etc.

[200] En otras formas de realización, la presente divulgación puede referirse al uso de composiciones de vehículo lipídico farmacéutico que incluyen composiciones que comprenden a las células NK y opcionalmente un solvente acuoso. Como se usa en la presente, el término “lípidos” se definirá para que incluya cualquiera de un rango amplio de sustancias que son característicamente insolubles en agua y que se pueden extraer con un solvente orgánico. Esta clase amplia de compuestos son bien conocidos por aquellos expertos en el arte, y del modo que se usa el término “lípidos” en la presente, no se limita a ninguna estructura en particular. Los ejemplos incluyen compuestos que contienen hidrocarburos alifáticos de cadena larga y sus derivados. Un lípido puede ser de orine natural o sintético (es decir, diseñado o elaborado por el hombre). Sin embargo, un lípido habitualmente es una sustancia biológica. Los lípidos biológicos son bien conocidos en el arte, e incluyen por ejemplo, grasas neutras, fosfolípidos, fosfoglicéridos, esteroides, terpenos, lisolípidos, glicoesfingolípidos, glicolípidos, sulfáticos, lípidos con ácidos grasos con unión éter o éster y lípidos polimerizables, y combinaciones de los mismos. Por supuesto que las composiciones y métodos de la presente invención también abarcan compuestos diferentes de aquellos descritos de manera específica en la presente que son comprendidos por un experto en el arte como lípidos.

[201] Un experto en el arte estará familiarizado con el rango de técnicas que se pueden emplear para dispersar una composición en un vehículo lipídico.

Por ejemplo, las composiciones que comprenden las células NK y anticuerpos se pueden dispersar en una solución que contiene un lípido, disolver con un lípido, emulsificar con un lípido, mezclar con un lípido, combinar con un lípido, unir de manera covalente con un lípido, contener como una suspensión en un lípido, contener o formar complejo con una micela o liposoma, o asociar de otra manera con un lípido o estructura lipídica mediante cualquier método conocido por aquellos expertos en el arte. La dispersión puede o no resultar en la formación de liposomas.

[202] La cantidad de dosificación real de una composición de la presente divulgación administrada a un paciente animal se puede determinar mediante factores físicos y fisiológicos tales como peso corporal, severidad de la condición, el tipo de enfermedad que se está tratando, intervenciones terapéuticas previas o concurrentes, idiopatía del paciente y la ruta de administración. Dependiendo de la dosificación y de la ruta de administración, el número de administraciones de una dosificación preferida y/o una cantidad eficaz puede variar de acuerdo con la respuesta del sujeto. El profesional responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la concentración del o los ingredientes activos en una composición y la o las dosis apropiadas para el sujeto individuo.

[203] En determinadas formas de realización, las composiciones farmacéuticas pueden comprender, por ejemplo, por lo menos aproximadamente 0,1% de un compuesto activo. En otras formas de realización, el compuesto activo puede comprender entre aproximadamente 2% y aproximadamente 75% del peso de la unidad, o entre aproximadamente 25% y aproximadamente 60%, por ejemplo, y cualquier rango que puede derivar del

mismo. De manera natural, la cantidad del o los compuestos activos en cada composición útil terapéuticamente se puede preparar de manera tal que se obtenga una dosificación adecuada en cualquier dosis unitaria dada del compuesto. Los factores tales como solubilidad, biodisponibilidad, vida media biológica, ruta de administración, vida útil del producto, así como otras consideraciones farmacéuticas serán contempladas por un experto en el arte de la preparación de dichas formulaciones farmacéuticas, y de esta manera, puede ser deseable una variedad de dosificaciones y regímenes de tratamiento.

[204] En otros ejemplos no limitantes, una dosis también puede comprender entre aproximadamente 1 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 5 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 10 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 50 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 100 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 200 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 350 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 500 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 1 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 5 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 10 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 50 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 100 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 200 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 350 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 500 miligramos/kg/peso corporal, y aproximadamente 1000 mg/kg/peso corporal o más por administración, y cualquier rango que deriva de los mismos. En los ejemplos no limitantes de un rango derivado de los números listados en la presente, se puede administrar un rango de entre

aproximadamente 5 mg/kg/peso corporal y aproximadamente 100 mg/kg/peso corporal, entre aproximadamente 5 microgramos/kg/peso corporal y aproximadamente 500 miligramos/kg/peso corporal, etc., en base a los números descritos precedentemente.

[205] Las composiciones terapéuticas que comprenden las células NK de la divulgación se pueden administrar mediante infusión, por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, tópica, oral, transdérmica, intraperitoneal, intraorbital, mediante implante, mediante inhalación, intratecal, intraventricular, o intranasal. La dosificación apropiada se puede determinar para el tipo de enfermedad a tratar, severidad y curso de la enfermedad, la condición clínica del individuo, la historia clínica del individuo y la respuesta al tratamiento, y la discreción del médico a cargo.

[206] Los tratamientos pueden incluir diferentes “dosis unitarias”. La dosis unitaria se define como que contiene una cantidad predeterminada de la composición terapéutica. La cantidad a administrar, y la ruta particular y formulación, se encuentra dentro de la habilidad de determinación de aquellos que se encuentran en el arte de la clínica. Una dosis unitaria no necesita ser administrada como una inyección individual pero puede comprender la infusión continua durante un periodo determinado de tiempo. En algunas formas de realización, una dosis unitaria comprende una dosis administrable única.

[207] En formas de realización particulares, la dosis para la administración a un individuo que lo requiere, incluyendo por lo menos mediante infusión, es de entre 10⁵ y 10¹⁰ células/kg/dosis/semana, y cualquier rango que derive del mismo.

[208] La cantidad a administrar, de acuerdo con el número de tratamientos y la dosis unitaria, depende del efecto de tratamiento deseado. Se comprende que una dosis eficaz se refiere a una cantidad necesaria para alcanzar un efecto particular. En la práctica, en determinadas formas de realización, se contempla que las dosis en el rango entre 10 mg/kg y 200 mg/kg pueden afectar la capacidad protectora de estos agentes. Por lo tanto, se contempla que las dosis incluyen dosis de aproximadamente 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, y 200, 300, 400, 500, 1000 $\mu\text{g/kg}$, mg/kg , $\mu\text{g/día}$, o mg/día o cualquier rango que pueda derivar de los mismos. Además, dichas dosis se pueden administrar en varias veces durante un día, y/o en múltiples días, semanas o meses.

[209] En determinadas formas de realización, la dosis eficaz de la composición farmacéutica es una que puede proveer un nivel de sangre de entre aproximadamente 1 μM y 150 μM . En otra forma de realización, la dosis eficaz provee un nivel en sangre de entre aproximadamente 4 μM y 100 μM .; o entre aproximadamente 1 μM y 100 μM ; o entre aproximadamente 1 μM y 50 μM ; o entre aproximadamente 1 μM y 40 μM ; o entre aproximadamente 1 μM y 30 μM ; o entre aproximadamente 1 μM y 20 μM ; o entre aproximadamente 1 μM y 10 μM ; o entre aproximadamente 10 μM y 150 μM ; o entre aproximadamente 10 μM y 100 μM ; o entre aproximadamente 10 μM y 50 μM ; o entre aproximadamente 25 μM y 150 μM ; o entre aproximadamente 25 μM y 100 μM ; o entre aproximadamente 25 μM y 50 μM ; o entre aproximadamente 50 μM y 150 μM ; o entre aproximadamente 50 μM y 100 μM (o cualquier rango que pueda derivar de los mismos). En otras formas de realización, la dosis

puede proveer el siguiente nivel en sangre del agente que resulta de un agente terapéutico que está siendo administrado a un sujeto: aproximadamente, por lo menos aproximadamente, o como máximo aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 μM o cualquier rango que pueda derivar de los mismos. En determinadas formas de realización, el agente terapéutico que se administra a un sujeto es metabolizado en el cuerpo a un agente terapéutico metabolizado, en cuyo caso los niveles en sangre pueden referirse a la cantidad de ese agente. Como alternativa, en la medida que el agente terapéutico no sea metabolizado por un sujeto, los niveles en sangre descritos en la presente pueden referirse al agente terapéutico no metabolizado.

A. Composiciones y Formulaciones Alimenticias

[210] En formas de realización particulares de la presente divulgación, las composiciones que comprenden las células NK y anticuerpos son formuladas para ser administradas mediante una ruta de alimentación. Las rutas de alimentación incluyen todas las rutas posibles de administración en las cuales la composición está en contacto directo con el tracto alimenticio. De manera específica, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente se pueden administrar por vía oral, bucal, rectal o sublingual. Como tales, estas composiciones se pueden formular con un diluyente inerte o con un vehículo comestible asimilable, o pueden ser encapsuladas en cápsulas de gelatina de

recubrimiento duro o blando, o pueden ser comprimidas en pastillas, o pueden ser incorporadas directamente con los alimentos de la dieta.

[211] En determinadas formas de realización, los compuestos activos se pueden incorporar con excipientes y ser usados en la forma de comprimidos que se pueden ingerir, comprimidos bucales, pastillas, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares (Mathiowitz y col., 1997; Hwang y col., 1998; Patentes de los EE.UU. Nos. 5.641.515; 5.580.579 y 5.792.451, cada una de las cuales se incorpora de manera específica a la presente a modo de referencia en su totalidad). Los comprimidos, pastillas, píldoras, cápsulas y similares también pueden contener lo siguiente: un aglutinante, tal como, por ejemplo, goma tragacanto, acacia, almidón de maíz, gelatina o combinaciones de los mismos; un excipiente, tal como, por ejemplo, fosfato dicálcico, manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio o combinaciones de los mismos; un agente desintegrante, tal como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de papa, ácido algínico o combinaciones de los mismos; un lubricante, tal como, por ejemplo, estearato de magnesio; un agente edulcorante, tal como, por ejemplo, sacarosa, lactosa, sacarina o combinaciones de los mismos; un agente saborizante, tal como, por ejemplo menta, aceite de gaulteria, saborizante cereza, saborizante naranja, etc. Cuando la forma unitaria de dosificación es una cápsula, puede contener, además de los materiales de los tipos precedentes, un vehículo líquido. Puede haber presentes otros materiales diferentes como recubrimientos o para modificar de otra manera la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, los comprimidos, píldoras, o cápsulas pueden ser recubiertos con goma laca, azúcar, o ambos. Cuando la

forma de dosificación es una cápsula, puede contener, además de los materiales de los tipos precedentes, vehículos tales como vehículos líquidos. Las cápsulas, comprimidos o píldoras de gelatina pueden tener un recubierto entérico. Los recubrimientos entéricos previenen la desnaturalización de la composición en el estómago o intestino superior en donde el pH es ácido. Véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. No. 5.629.001. Cuando alcanza el intestino delgado, el pH básico en el mismo disuelve el recubrimiento y permite que se libere la composición y sea absorbida por células especializadas, por ejemplo, enterocitos epiteliales y células M de las placas de Peyer. Un jarabe de elixir puede contener el compuesto activo sacarosa como agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, un colorante y saborizante, tal como sabor a cereza o naranja. Por supuesto que cualquier material usado para la preparación de cualquier forma unitaria de dosificación debe ser farmacéuticamente puro y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, los compuestos activos pueden ser incorporados en preparaciones y formulaciones de liberación sostenida.

[212] Para la administración oral las composiciones de la presente divulgación pueden ser incorporadas como alternativa con uno o más excipientes en la forma de enjuague bucal, dentífrico, comprimido bucal, aspersion oral, o formulación administrada por vía oral sublingual. Por ejemplo, un enjuague bucal se puede preparar incorporando el ingrediente activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado, tal como una solución de borato de sodio (solución de Dobell). Como alternativa, el ingrediente activo puede ser incorporado en solución oral tal como una que contiene borato de sodio, glicerina y bicarbonato de potasio, o dispersado en un dentífrico, o agregado en

una cantidad terapéuticamente eficaz a una composición que puede incluir agua, aglutinantes, abrasivos, agentes saborizantes, agentes espumantes y humectantes. Como alternativa, las composiciones se pueden diseñar en forma de comprimido o solución que se puede colocar debajo de la lengua o disolver de otra manera en la boca.

[213] Las formulaciones adicionales que son adecuadas para otros modos de administración alimenticia incluyen supositorios. Los supositorios son formas de dosificación sólidas de diferentes pesos y formas, habitualmente medicados, para insertar en el recto. Después de la inserción, los supositorios se ablandan, se funden o se disuelven en los fluidos de la cavidad. En general, para supositorios, los vehículos tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles, triglicéridos o combinaciones de los mismos. En determinadas formas de realización, los supositorios pueden estar formados a partir de mezclas que contienen, por ejemplo, el ingrediente activo en el rango de entre aproximadamente 0,5% y aproximadamente 10%, y preferiblemente entre aproximadamente 1% y aproximadamente 2%.

B. Composiciones y Formulaciones Parenterales

[214] En otras formas de realización, las composiciones se pueden administrar mediante una ruta parenteral. Como se usa en la presente, el término “parenteral” incluye rutas que evitan el tracto alimenticio. De manera específica, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente se pueden administrar por ejemplo, pero no se limitan a por vía intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraarterial, intratecal, subcutáneo, o intraperitoneal Patentes de los EE.UU. Nos. 6.613.308; 5.466.468; 5.543.158;

5.641.515; y 5.399.363 (cada una de las cuales se incorpora de manera específica a la presente a modo de referencia en su totalidad).

[215] Las soluciones de los compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables se pueden preparar en agua mezcladas de manera adecuada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos. Las formas farmacéuticas adecuadas para el uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles (Patente de los EE.UU. 5.466.468, que se incorpora de manera específica a la presente a modo de referencia en su totalidad). En todos los casos la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida que sea posible una inyectabilidad fácil. Debe ser estable en las condiciones de elaboración y almacenamiento y debe ser protegida contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (es decir, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y/o aceites vegetales. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede lograr mediante diferentes agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos,

clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, resultará preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr mediante el uso en las composiciones de agentes retardadores de la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

[216] Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe ser amortiguada de manera adecuada si es necesario y el diluyente líquido primero debe ser llevado a isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. En este sentido, los medios acuosos estériles que se pueden emplear serán conocidos para aquellos expertos en el arte a la luz de la presente divulgación. Por ejemplo, una dosificación se puede disolver en solución isotónica de NaCl y agregar fluido para hipodermocclisis o inyectar en el sitio propuesto de infusión, (véase por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ta Edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Necesariamente se realizará alguna variación en la dosificación dependiendo de la condición del sujeto que está siendo tratado. La persona responsable de la administración, en cualquier caso, determinará la dosis apropiada para el individuo. Además, para la administración a humanos, las preparaciones deben cumplir con esterilidad, pirogenicidad, estándares de seguridad y pureza generales según lo requerido por la Oficina de estándares biológicos de la FDA.

[217] Las soluciones inyectables estériles se preparan mediante la incorporación de los compuestos activos en la cantidad requerida en el solvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados

precedentemente, según sea requerido, seguido por esterilización mediante filtración. En general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación de los diferentes ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados precedentemente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son las técnicas de secado por vacío y secado por congelamiento que generan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución previamente filtrada en esterilidad del mismo. Una composición en polvo se combina con un vehículo líquido tal como, por ejemplo, agua o una solución salina, con o sin un agente estabilizante.

C. Composiciones y Formulaciones Farmacéuticas Misceláneas

[218] En otras formas de realización particulares de la divulgación, las composiciones de compuesto activo que comprenden las células NK y anticuerpos se pueden formular para la administración mediante diferentes rutas misceláneas, por ejemplo, administración tópica (es decir, transdérmica), administración mucosa (intranasal, vaginal, etc.) y/o inhalación.

[219] Las composiciones farmacéuticas para la administración tópica pueden incluir el compuesto activo formulado para una aplicación médica tal como un ungüento, pasta, crema o polvo. Los ungüentos incluyen todas las composiciones basadas en aceite, para adsorción, para emulsión y solubles en agua para la aplicación tópica, mientras que las cremas y las lociones son aquellas composiciones que incluyen una sola base para emulsión. Los medicamentos administrados de manera tópica pueden contener un mejorador de la penetración para facilitar la adsorción de los ingredientes activos a través

de la piel. Los mejoradores de penetración incluyen glicerina, alcoholes, alquil metil sulfóxidos, pirrolidonas y luarocapram. Las bases posibles para las composiciones para la aplicación tópica incluyen polietilenglicol, lanolina, crema fría y petrolato así como cualquier otra base de ungüento adecuada para absorción, emulsión o soluble en agua. Las preparaciones tópicas también pueden incluir emulsificantes, agentes gelificantes, y conservantes antimicrobianos según sea necesario para conservar el ingrediente activo y proveer una mezcla homogénea. La administración transdérmica de la presente invención también puede comprender el uso de un "parche". Por ejemplo, el parche puede proveer una o más sustancias activas a una velocidad predeterminada y de una manera continua durante un periodo fijo de tiempo.

[220] En determinadas formas de realización, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar mediante gotas para los ojos, aerosoles intranasales, mediante inhalación, y/u otros vehículos de administración en aerosol. Los métodos para administrar composiciones directamente a los pulmones mediante aerosoles nasales han sido descritos por ejemplo, en las Patentes de los EE.UU. Nos. 5.756.353 y 5.804.212 (cada una se incorpora de manera específica a la presente a modo de referencia en su totalidad). De manera similar, la administración a los pulmones usando resinas de micropartículas intranasales (Takenaga y col., 1998) y compuestos de lisofosfatidil-glicerol (Patente de los EE.UU. No. 5.725.871, incorporada de manera específica a la presente a modo de referencia en su totalidad) también es bien conocida en el arte farmacéutico. De manera similar, la administración transmucosa en la forma de una matriz soporte de politetrafluoroetileno se

describe en la Patente de los EE.UU. No. 5.780.045 (incorporada de manera específica a la presente a modo de referencia en su totalidad).

[221] El término aerosol se refiere a un sistema coloidal de sólido finamente dividido de partículas líquidas dispersadas en un gas propelente licuado o presurizado. El aerosol típico de la presente invención para inhalación consistirá en una suspensión de ingredientes activos en un propelente líquido o una mezcla de propelentes líquidos y un solvente adecuado. Los propelentes adecuados incluyen hidrocarburos y éteres de hidrocarburos. Los recipientes adecuados variarán de acuerdo con los requerimientos de presión del propelente. La administración del aerosol variará de acuerdo con la edad, peso y la severidad y respuesta de los síntomas del sujeto.

VIII. Terapias Combinadas

[222] En determinadas formas de realización, las composiciones y los métodos de las presentes formas de realización involucran una población de células del sistema inmunológico (que incluye población de células NK) en combinación con al menos una terapia adicional. La terapia adicional puede ser terapia por radiación, cirugía (por ejemplo, lumpectomía y una mastectomía), quimioterapia, terapia génica, terapia con ADN, terapia viral, terapia con ARN, inmunoterapia, trasplante de médula ósea, nanoterapia, terapia con anticuerpo monoclonal, terapia con hormonas, virus oncolíticos, o una combinación de los precedentes. La terapia adicional puede ser en la forma de terapia con adyuvante o neoadyuvante.

[223] En algunas formas de realización, la terapia adicional comprende la administración de un inhibidor enzimático de molécula pequeña o un agente antimetastásico. En algunas formas de realización, la terapia adicional

comprende la administración de agentes limitantes de efectos secundarios (por ejemplo, agentes destinados a disminuir la aparición y/o severidad de efectos secundarios del tratamiento, tales como agentes antieméticos, *etc.*). En algunas formas de realización, la terapia adicional es una terapia de radiación. En algunas formas de realización, la terapia adicional es una cirugía. En algunas formas de realización, la terapia adicional es una combinación de una terapia de radiación y cirugía. En algunas formas de realización, la terapia adicional es irradiación con rayos gamma. En algunas formas de realización, la terapia adicional es una terapia dirigida a la vía PBK/AKT/mTOR, un inhibidor de HSP90, un inhibidor de tubulina, un inhibidor de la apoptosis y/o un agente quimiopreventivo. La terapia adicional puede comprender una o más entre los agentes quimioterapéuticos conocidos en el arte.

[224] En formas de realización particulares, además de la terapia celular inventiva de la divulgación, el individuo puede haber recibido, puede estar recibiendo, y/o podrá recibir una terapia adicional específica contra el cáncer, incluyendo uno o más de cirugía, radiación, inmunoterapia (distinta a la terapia celular de la presente divulgación), terapia con hormonas, terapia génica, quimioterapia, *etc.*

[225] Una terapia con células del sistema inmunológico se puede administrar antes, durante, después o en diversas combinaciones con relación a una terapia contra el cáncer adicional. Las administraciones se pueden aplicar en intervalos que varía entre concurrente a minutos y días a semanas. En las formas de realización donde la terapia con células del sistema inmunológico se provee a un paciente separadamente de un agente terapéutico adicional, en general se intenta asegurar que no transcurra un período de

tiempo significativo entre el momento de cada administración, de manera tal que los dos compuestos aún puedan ejercer un efecto ventajosamente combinado en el paciente. En tales casos, se contempla que se podría proveerle al paciente una terapia con anticuerpos y la terapia anticáncer separadas aproximadamente entre 12 y 24 o 72 h entre sí y, más particularmente, separadas aproximadamente 6-12 h entre sí. En algunas situaciones puede ser deseable extender significativamente el período de tiempo del tratamiento, donde pueden transcurrir entre varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7) y varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) entre las respectivas administraciones.

[226] Se pueden emplear varias combinaciones. En el siguiente ejemplo, la terapia con células del sistema inmunológico es “A” y la terapia anticáncer es “B”:

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

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

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

[227] La administración de cualquier compuesto o terapia celular de las formas de realización de la presente a un paciente se efectuará según los protocolos generales para la administración de dichos compuestos, teniendo en cuenta la toxicidad, si hubiera alguna, de los agentes. Por ello, en algunas formas de realización hay un paso de monitoreo de la toxicidad atribuible a la terapia combinada.

A. Quimioterapia

[228] Se puede utilizar una amplia variedad de agentes quimioterapéuticos de acuerdo con las formas de realización de la presente. El término

“quimioterapia” se refiere al uso de fármacos para tratar al cáncer. Un “agente quimioterapéutico” se usa para indicar un compuesto o una composición que se administra en el tratamiento de un cáncer. Estos agentes o fármacos se clasifican según su modo de acción dentro de una célula, por ejemplo, si afectan alguna etapa del ciclo celular, y en tal caso cuál. Como alternativa, un agente se puede caracterizar en base a su capacidad para entrecruzarse con el ADN de manera directa, para intercalarse en el ADN o para inducir aberraciones cromosómicas y mitóticas porque afecta la síntesis de ácidos nucleicos.

[229] Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclosfosfamida; alquilsulfonatos tal como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocuna, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (en especial bullatacina y bullatacinona); una camptotecina (que incluye el análogo sintético topotecán); briostatina; callistatina; CC-1065 (inclusive sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (en particular criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (inclusive los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos

tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, caliqueamicina, en especial caliqueamicina gamma1 y caliqueamicina omega1; dinemicina, inclusive dinemicina A; bisfosfonatos, tal como clodronato; una esperamicina; así como un cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos de enediina de cromoproteínas relacionados), aclacinomicinas, actinomicina, antramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (que incluye morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolin-doxorubicina y desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcellomicina, mitomicinas tal como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina y zorubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, pteropterina y trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina y tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina y floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano y testolactona; antiadrenales tales como mitotano y trilostano; reforzador de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; aldofosfamidaglicósido; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfomitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona;

mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacáridos PSK; razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2''-triclortrietilamina; tricotecenos (en especial la toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; taxoides, por ejemplo, paclitaxel y docetaxel gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; complejos de coordinación de platino tales como cisplatino, oxaliplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; irinotecano (por ejemplo, CPT-11); inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tal como ácido retinoico; capecitabina; carboplatino, procarbazona, plicomicina, gemcitabina, navelbina, inhibidores de farnesil proteína transferasa, transplatino y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de ellos.

B. Radioterapia

[230] Otros factores que causan daño en el ADN y que se han utilizado ampliamente incluyen los que comúnmente se conocen como rayos γ , rayos X y/o la administración dirigida de radioisótopos a las células tumorales. También se contemplan otras formas de factores que dañan el ADN, tales como microondas, irradiación de haces de protones (Patentes de los EE.UU. N°: 5.760.395 y 4.870.287) e irradiación UV. Es muy probable que todos estos factores puedan afectar un amplio rango de daños en el ADN, en los

precursores de ADN, en la replicación y reparación de ADN y en el ensamblaje y el mantenimiento de los cromosomas. Los rangos de dosificación para los rayos X abarcan entre dosis diarias de 50 a 200 roentgens por períodos de tiempo prolongados (3 a 4 semanas) y dosis individuales de entre 2000 y 6000 roentgens. Los rangos de dosificación para los radioisótopos varían ampliamente, y dependen de la vida media del isótopo, la fuerza y el tipo de radiación emitida, y de la captación por las células neoplásicas.

C. Inmunoterapia

[231] El especialista comprenderá que se pueden emplear inmunoterapias adicionales en combinación o junto con los métodos de las formas de realización. En el contexto del tratamiento del cáncer, los agentes inmunoterapéuticos se basan, en general, en el uso de células y moléculas inmunológicas efectoras para buscar como blancos y destruir a las células cancerosas. El rituximab (RITUXAN®) constituye un ejemplo de ellos. Los efectores inmunológicos pueden comprender, por ejemplo, un anticuerpo específico de algún marcador presente sobre la superficie de una célula tumoral. El anticuerpo solo puede servir como un efector de la terapia o puede reclutar otras células para afectar realmente la muerte de las células. El anticuerpo también se puede conjugar con un fármaco o una toxina (quimioterapéutico, radionúclido, cadena de ricina A, toxina de la cólera, toxina de Pertussis, etc.) y sirve como un agente de direccionamiento. Como alternativa, el efector puede ser un linfocito portador de una molécula de la superficie que interactúa, ya sea de manera directa o indirecta, con una célula tumoral blanco. Las diversas células efectoras incluyen células T citotóxicas y células NK.

[232] Los conjugados de anticuerpo-fármaco han surgido como un gran enfoque para el desarrollo de agentes terapéuticos contra el cáncer. El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) comprenden anticuerpos monoclonales (MAb) que están unidos de manera covalente con fármacos capaces de matar a las células. Este enfoque combina la gran especificidad de los MAb contra sus blancos de antígeno con fármacos citotóxicos muy potentes, lo cual da como resultado MAb “armados” que administran la carga (fármaco) a las células tumorales con niveles enriquecidos del antígeno. La administración dirigida del fármaco también minimiza su exposición a tejidos normales, dando como resultado una menor toxicidad y un índice terapéutico mejorado. La aprobación de dos fármacos ADC, ADCETRIS® (brentuximab vedotina) en el 2011 y KADCYLA® (trastuzumab emtansina o T-DM1) en el 2013 por la FDA ha validado este enfoque. Actualmente hay más de 30 candidatos de fármacos de ADC en diversas etapas de ensayos clínicos para el tratamiento de cáncer (Leal y col., 2014). Dado que la modificación genética de anticuerpos y la optimización de conector-carga se están volviendo cada vez más maduras, el descubrimiento y desarrollo de nuevos ADC dependen de manera creciente de la identificación y validación de nuevos blancos que sean adecuados para este enfoque y la generación de MAb de direccionamiento. Dos criterios de los blancos de ADC comprenden niveles de expresión aumentados/altos en las células tumorales y una internalización robusta.

[233] En un aspecto de la inmunoterapia, la célula tumoral debe portar algún marcador que sea susceptible al direccionamiento, es decir, que no está presente sobre la mayoría de las demás células. Existen muchos marcadores

tumorales y cualquiera de ellos puede ser adecuado para el direccionamiento en el contexto de las formas de realización de la presente. Los marcadores tumorales comunes incluyen CD20, el antígeno carcinoembrionario, tirosinasa (p97), gp68, TAG-72, HMFG, el antígeno de sialilo de Lewis, MucA, MucB, PLAP, el receptor de laminina, erb B y p155. Un aspecto alternativo de la inmunoterapia comprende combinar los efectos anticáncer con los efectos inmunoestimulantes. También existen moléculas inmunoestimulantes que incluyen: citoquinas, tales como IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSF, gamma-IFN, quimioquinas, tales como MIP-1, MCP-1, IL-8, y factores de crecimiento, tal como el ligando FLT3.

[234] Los ejemplos de las inmunoterapias que actualmente se encuentran bajo investigación o en uso se pueden mencionar los inmunoadyuvantes, por ejemplo, *Mycobacterium bovis*, *Plasmodium falciparum*, dinitroclorobenceno y compuestos aromáticos (Patentes de los EE.UU. N°: 5.801.005 y 5.739.169; Hui y Hashimoto, 1998; Christodoulides y col., 1998); terapias con citoquinas, por ejemplo, los interferones α , β y γ , IL-1, GM-CSF y TNF (Bukowski y col., 1998; Davidson y col., 1998; Hellstrand y col., 1998); terapias genéticas, por ejemplo, TNF, IL-1, IL-2 y p53 (Qin y col., 1998; Austin-Ward y Villaseca, 1998; Patentes de los EE.UU. N°: 5.830.880 y 5.846.945); y anticuerpos monoclonales, por ejemplo, anti-CD20, anti-gangliósido GM2 y anti-p185 (Hollander, 2012; Hanibuchi y col., 1998; Patente de los EE.UU. N°: 5.824.311). Se contempla que se podrá utilizar una o más terapias anticáncer con las terapias de anticuerpos que se describen en la presente.

[235] En algunas formas de realización, la inmunoterapia puede ser un inhibidor de un punto de control inmunológico. Los puntos de control

inmunológicos aumentan una señal (por ejemplo, moléculas coestimulantes) o disminuyen una señal. Los puntos de control inmunológicos inhibidores que pueden ser de interés para el bloqueo de un punto de control inmunológico incluyen el receptor de adenosina A2A (A2AR), B7-H3 (también conocido como CD276), un atenuante de linfocitos B y T (BTLA), la proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4, también conocida como CD152), indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), inmunoglobulina de células asesinas (KIR), gen de activación de linfocitos 3 (LAG3), muerte programada 1 (PD-1), el dominio de inmunoglobulina de células T y el dominio de mucina 3 (TIM-3) y el supresor del dominio V de Ig de la activación de células T (VISTA). En particular, los inhibidores de puntos de control inmunológicos están dirigidos al eje PD-1 y/o a CTLA-4.

[236] Los inhibidores de puntos de control inmunológicos pueden ser fármacos tales como moléculas pequeñas, formas recombinantes de ligandos o receptores o, en particular, son anticuerpos, tales como anticuerpos humanos (por ejemplo, de la publicación de Patente Internacional WO2015016718; Pardoll, *Nat Rev Cancer*, 12(4): 252-64, 2012; ambas incorporadas en la presente a modo de referencia). Se pueden utilizar los inhibidores conocidos de las proteínas de los puntos de control inmunológico o sus análogos, en particular se pueden usar las formas quimerizadas, humanizadas o humanas de los anticuerpos. Como es de conocimiento del especialista, se pueden usar nombres alternativos y/o equivalentes para algunos de los anticuerpos mencionados en la presente divulgación. Dichos nombres alternativos y/o equivalentes se utilizarán indistintamente en el contexto de la presente

divulgación. Por ejemplo, se sabe que el lambrolizumab también se conoce con los nombres alternativos y equivalentes de MK-3475 y pembrolizumab.

[237] En algunas formas de realización, el antagonista de la unión a PD-1 es una molécula que inhibe la unión de PD-1 a sus miembros de unión o ligandos. En un aspecto específico, los miembros de unión o ligandos de PD-1 son PDL1 y/o PDL2. En otra forma de realización, un antagonista de unión a PDL1 es una molécula que inhibe la unión de PDL1 a sus miembros de unión. En un aspecto específico, los miembros de unión de PDL1 son PD-1 y/o B7-1. En otra forma de realización, un antagonista de unión a PDL2 es una molécula que inhibe la unión de PDL2 a sus miembros de unión. En un aspecto específico, un miembro de unión de PDL2 es PD-1. El antagonista puede ser un anticuerpo, un fragmento de unión al antígeno del mismo, una inmunoadhesina, una proteína de fusión o un oligopéptido. Los ejemplos de anticuerpos se describen en las Patentes de los EE.UU. N°: US8735553, US8354509 y US8008449, todas incorporadas en la presente a modo de referencia. Otros antagonistas del eje PD-1 para usar en los métodos provistos en la presente son conocidos en el arte, tales como los que se describen en las Solicitudes de Patente de los EE.UU. N°: US20140294898, US2014022021 y US20110008369, todas incorporadas en la presente a modo de referencia.

[238] En algunas formas de realización, el antagonista de unión a PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 (por ejemplo, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico). En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-PD-1 se selecciona del grupo que consiste en nivolumab, pembrolizumab y CT-011. En algunas formas de realización, el antagonista de unión a PD-1 es una inmunoadhesina (por ejemplo, una inmunoadhesina que

comprende una porción extracelular o de unión a PD-1 de PDL1 o PDL2 fusionada a una región constante (por ejemplo, una región Fc de una secuencia de inmunoglobulina). En algunas formas de realización, el antagonista de unión a PD-1 es AMP- 224. El nivolumab, también conocido como MDX-1106-04, MDX-1106, ONO-4538, BMS-936558 y OPDIVO®, es un anticuerpo anti-PD-1 descrito en WO2006/121168. El pembrolizumab, también conocido como MK-3475, Merck 3475, lambrolizumab, KEYTRUDA® y SCH-900475, es un anticuerpo anti-PD-1 descrito en WO2009/114335. El CT-011, también conocido como hBAT o hBAT-1, es un anticuerpo anti-PD-1 descrito en WO2009/101611. El AMP-224, también conocido como B7-DCIg, es un receptor soluble de la fusión PDL2-Fc descrito en WO2010/027827 y WO2011/066342.

[239] Otro punto de control inmunológico que se puede usar en los métodos provistos en la presente es la proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), también conocida como CD152. La secuencia de ADNc completa de la CTLA-4 humana tiene el N° Acceso en Genbank, L15006. La CTLA-4 está presente sobre la superficie de las células T y actúa como un “interruptor” cuando se une a CD80 o CD86 sobre la superficie de células presentadoras de antígenos. La CTLA4 es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas que se expresa sobre la superficie de células T ayudantes y transmite una señal inhibidora a las células T. La CTLA4 es similar a la proteína coestimulante de células T, CD28, y ambas moléculas se unen a CD80 y CD86, también denominados B7-1 y B7-2, respectivamente, sobre las células presentadoras de antígenos. La CTLA4 transmite una señal inhibidora a las células T, en tanto CD28 transmite una señal estimulante. La CTLA4

intracelular también se encuentra en las células T reguladoras y puede ser importante para su función. La activación de células T a través del receptor de células T y CD28 conduce a una mayor expresión de CTLA-4, un receptor inhibidor para las moléculas B7.

[240] En algunas formas de realización, el inhibidor de un punto de control inmunológico es un anticuerpo anti-CTLA-4 (por ejemplo, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico), un fragmento de unión al antígeno del mismo, una inmunoadhesina, una proteína de fusión o un oligopéptido.

[241] Los anticuerpos anti-CTLA-4 humana (o los dominios VH y/o VL derivados de los mismos) adecuados para usar en los métodos de la presente se pueden generar usando métodos bien conocidos en el arte. Como alternativa, se pueden utilizar los anticuerpos anti-CTLA-4 conocidos en el arte. Por ejemplo, se pueden utilizar los anticuerpos anti-CTLA-4 que se divulgan en: US 8.119.129, WO 01/14424, WO 98/42752; WO 00/37504 (CP675.206, también conocido como tremelimumab; antes ticilimumab), la Patente de los EE.UU. N°: 6.207.156; Hurwitz y col., (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95(17): 10067-10071; Camacho y col., (2004) *J Clin Oncology* 22(145): Resumen N° 2505 (anticuerpo anti-CP-675206); y Mokyr y col., (1998) *Cancer Res* 58: 5301-5304, en los métodos que se divulgan en la presente. Las descripciones de cada una de las publicaciones mencionadas precedentemente se incorporan en la presente a modo de referencia. Se pueden usar asimismo los anticuerpos que compiten con cualquiera de estos anticuerpos reconocidos en el arte para la unión a CTLA-4. Por ejemplo, se describe un anticuerpo anti-CTLA-4 humanizado en la Solicitud de Patente Internacional N° WO2001014424,

WO2000037504, y en la Patente de los EE.UU. N°: 8.017.114; todas incorporadas en la presente a modo de referencia.

[242] Un ejemplo del anticuerpo anti-CTLA-4 es ipilimumab (también conocido como 10D1, MDX- 010, MDX- 101 y Yervoy®) o fragmentos de unión al antígeno y variantes del mismo (véase, por ejemplo, WO 01/14424). En otras formas de realización, el anticuerpo comprende las CDR o VR de las cadenas pesada y liviana de ipilimumab. Por lo tanto, en una forma de realización, el anticuerpo comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la región VH de ipilimumab, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la región VL de ipilimumab. En otra forma de realización, el anticuerpo compite por la unión y/o se une al mismo epítopo sobre CTLA-4 que los anticuerpos mencionados precedentemente. En otra forma de realización, el anticuerpo presenta por lo menos aproximadamente 90% de identidad de la secuencia de aminoácidos de la región variable con los anticuerpos mencionados precedentemente (por ejemplo, por lo menos aproximadamente un 90%, 95% o 99% de identidad de la región variable con ipilimumab).

[243] Otras moléculas para modular CTLA-4 incluyen los ligandos y receptores de CTLA-4 tales como los que se describen en las Patentes de los EE.UU. N°: US5844905, US5885796 y en las Solicitudes de Patente Internacional N° WO1995001994 y WO1998042752; todas incorporadas en la presente a modo de referencia, y las inmunoadhesinas tales como las que se describen en la Patente de los EE.UU. N°: US8329867, incorporada en la presente a modo de referencia.

D. Cirugía

[244] Aproximadamente un 60% de las personas con cáncer será sometido a algún tipo de cirugía, que incluyen una cirugía preventiva, de diagnóstico o determinación de etapa, curativa y paliativa. Una cirugía curativa incluye una resección en donde todo o parte del tejido canceroso es eliminado, recortado y/o destruido físicamente y se puede usar junto con otras terapias, tal como el tratamiento de las formas de realización de la presente, una quimioterapia, radioterapia, una terapia hormonal, una terapia genética, una inmunoterapia y/o terapias alternativas. La resección de un tumor se refiere a la eliminación física de por lo menos una parte de un tumor. Además de la resección del tumor, el tratamiento mediante cirugía incluye cirugía láser, criocirugía, electrocirugía y cirugía controlada por microscopio (cirugía de Mohs).

[245] Tras la escisión de parte o todas las células, tejido o tumor cancerosos, se puede formar una cavidad en el cuerpo. El tratamiento se puede llevar a cabo mediante perfusión, inyección directa o aplicación local en el área con una terapia anticáncer adicional. Dicho tratamiento se puede repetir, por ejemplo, cada 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, o cada 1, 2, 3, 4 y 5 semanas o cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. Estos tratamientos pueden asimismo comprender dosificaciones variables.

E. Otros Agentes

[246] Se contempla el uso de otros agentes en combinación con determinados aspectos de las formas de realización de la presente para mejorar la eficacia terapéutica del tratamiento. Estos agentes adicionales incluyen agentes que afectan un aumento de la expresión de receptores de la superficie celular y uniones GAP, agentes citostáticos y de diferenciación, inhibidores de la adhesión celular, agentes que aumentan la sensibilidad de las

células hiperproliferativas a los inductores de apoptosis u otros agentes biológicos. Los aumentos en la señalización intercelular mediante una elevación de la cantidad de uniones GAP aumentarían los efectos antihiperproliferativos sobre la población de células hiperproliferativas vecinas. En otras formas de realización, se pueden usar agentes citostáticos o de diferenciación en combinación con determinados aspectos de las formas de realización de la presente para mejorar la eficacia antihiperproliferativa de los tratamientos. Se contempla el uso de inhibidores de la adhesión celular para mejorar la eficacia de las formas de realización de la presente. Los ejemplos de inhibidores de la adhesión celular comprenden inhibidores de la quinasa de adhesión focal (FAK) y lovastatina. Se contempla además que se podrían usar otros agentes capaces de aumentar la sensibilidad de una célula hiperproliferativa a la apoptosis, tal como el anticuerpo c225, en combinación con determinados aspectos de las formas de realización de la presente a fin de mejorar la eficacia del tratamiento.

IX. Kits de la Divulgación

[247] Cualquiera de las composiciones que se describen en la presente puede estar comprendida en un kit. En un ejemplo no limitante, las células, reactivos para producir células, vectores y reactivos para producir vectores y/o componentes de los mismos pueden estar comprendidos en un kit. En determinadas formas de realización, las células NK pueden estar comprendidas en un kit, y las mismas pueden o pueden aún no expresar un CAR que comprende (a) bisagra de CD28, (b1) dominio transmembrana de CD28 o (b2) dominio transmembrana de DAP10, y (c) dominio coestimulador de DAP10, una citoquina opcional, o un gen suicida opcional. Dicho kit puede tener o no

uno o más reactivos para la manipulación de las células. Dichos reactivos incluyen moléculas pequeñas, proteínas, ácidos nucleicos, anticuerpos, soluciones amortiguadoras, cebadores, nucleótidos, sales, y/o una combinación de los mismos, por ejemplo. Los nucleótidos que codifican para uno o más CAR, productos de genes suicidas, y/o citoquinas pueden estar incluidos en el kit. Puede haber proteínas, tales como citoquinas o anticuerpos, incluyendo anticuerpos monoclonales, incluidos en el kit. Puede haber nucleótidos que codifican para componentes o para todos los receptores CAR modificados incluidos en el kit, incluyendo los reactivos para generarlos.

[248] En aspectos particulares, el kit comprende la terapia con células NK de la divulgación y también otra terapia contra el cáncer. En algunos casos, el kit, además de las formas de realización de terapia celular, también incluye una segunda terapia contra el cáncer, tal como quimioterapia, terapia con hormonas, y/o inmunoterapia, por ejemplo. El o los kits pueden estar direccionados a un cáncer particular para un individuo y comprender las respectivas segundas terapias contra el cáncer para el individuo.

[249] Los kits pueden comprender composiciones separadas en alícuotas de manera adecuada de la presente divulgación. Los componentes de los kits se pueden envasar en medio acuoso o de forma liofilizada. El envase de los kits en general incluirá por lo menos un vial, tubo de ensayo, frasco, botella, jeringa u otro envase, en el que se puede colocar un componente, y preferiblemente, separado en alícuotas de manera adecuada. En los casos en los que hay más de un componente en el kit, en general el kit también puede contener un segundo, tercero y otro recipiente adicional en los que se pueden colocar en forma separada los componentes adicionales. Sin embargo, puede

haber varias combinaciones de componentes en un vial. Los kits de la presente invención típicamente también incluirán un medio para contener la composición y cualquier otro envase de reactivo en confinamiento cerrado para la venta comercial. Dichos recipientes pueden incluir recipientes de plástico moldeados por inyección o por soplado en los que se colocan los viales deseados.

X. Ejemplos

[250] Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar ciertas formas de realización de la invención. Los expertos en la materia han de apreciar que las técnicas que se divulgan en los ejemplos siguientes representan técnicas descubiertas por el inventor para funcionar bien en la práctica de la invención, y por lo tanto puede considerarse que estas constituyen ciertos modos para su práctica. Sin embargo, a la luz de la presente divulgación, los expertos en la materia deben apreciar que se pueden hacer muchos cambios a las formas de realización específicas que se divulgan y aun así obtener un resultado parecido o similar sin alejarse del espíritu y alcance de la invención.

EJEMPLO 1

COMPONENTES DE CONSTRUCCIÓN DE CAR CON SEÑALIZACIÓN MEJORADA

[251] Las Figuras 1A-1B demuestran que el dominio de señalización de DAP10 confiere un fenotipo activado a las células CAR-NK CD5, y la determinación de fenotipo se realizó usando un panel de citometría de masas. Usando incrustación de vecinos estocásticos distribuidos en t (TSNE), un método estadístico para visualizar datos de alta dimensión otorgándole a cada punto una ubicación en un mapa de dos o tres dimensiones, se producen diferentes agrupamientos en comparación con las células NT no transducidas

(izquierda) y las células NK que expresan un CAR CD5 que comprende la bisagra de IgG, el dominio transmembrana de CD28, DAP10 y CD3zeta (CD5CAR-NK CD28TMDAP10CD3z) (Figura 1A). Los agrupamientos 8 y 11, los 2 nuevos agrupamientos que se expresan en las células CAR-NK CD5, están indicados mediante círculos y rectángulos. El mapa de calor de la Figura 1B indica la expresión normalizada de varios marcadores (indicado en el eje X) de cada agrupamiento (indicado en el eje Y). Los marcadores de activación, citotoxicidad y maduración con alta expresión en los agrupamientos #8 y #11 están indicados con los rectángulos azules. Esto muestra que las células NK transducidas con DAP10 tienen dos poblaciones o agrupamientos que no están presentes en las células NK no transducidas. Estos agrupamientos contienen células NK que expresan mayores niveles de marcadores de activación, tales como granzima B, perforina, *etc.*

[252] Las Figuras 2A-2C demuestran que las células CAR-NK CD5 con el dominio coestimulador de DAP10 son capaces de producir múltiples citoquinas y quimoquinas efectoras y mostrar una mayor polifuncionalidad. La Figura 2A demuestra datos de secretoma de célula individual Isoplexis que muestran la polifuncionalidad de las células CAR-NK CD5 con el dominio coestimulador de DAP10 mediante la comparación de diferentes células CAR-NK CD5 con células NK no transducidas (NT). El CD5 CAR#5 (que comprende la bisagra de IgG, el dominio transmembrana de CD28, DAP10, y CD3z) muestra la mayor polifuncionalidad con el mayor porcentaje de células individuales que secretan 2, 3, 4 o 5+ proteínas a la vez. La Figura 2B provee un gráfico de barras que muestra el índice de fuerza de polifuncionalidad entre las diferentes células CAR-NK CD5 en comparación con las células NK no transducidas (NT). Aquí,

CD5 CAR#5 también demuestra la mayor polifuncionalidad con la mayor proporción de citoquinas efectoras y quimioattractantes. Un mapa de calor de polifuncionalidad muestra que las células CAR-NK CD5 con el dominio coestimulador de DAP10 tienen la mayor capacidad para secretar diversas permutaciones de citoquinas a nivel de célula individual (Figura 2C).

[253] Las células CAR-NK CD5 tanto con el TM de DAP10 como con el dominio coestimulador de DAP10 siguen matando a las líneas celulares T-ALL CD5+ (CCRF) después de múltiples reenfrentamientos en un ensayo de muerte Incucyte (Figuras 3A-3C). En la Figura 3A se provee un esquema de un estudio de reenfrentamiento por ensayo de muerte Incucyte. En la Figura 3B se provee la medida del recuento de color rojo (una medida del recuento de tumor vivo) después de cada reenfrentamiento tumoral (indicado por la flecha roja) entre las diversas condiciones para las células CAR-NK CD5. En la Figura 3C se provee la confluencia porcentual, una medida de la abundancia tumoral, después de cada reenfrentamiento tumoral (tiempos indicados por las flechas rosa). Estos datos demuestran que las células CAR-NK CD5 con TM de DAP10 y dominio coestimulador de DAP10 (representadas por las líneas rojas con cuadrados) siguen matando a la línea celular T-ALL CD5+ (CCRF) después de múltiples reenfrentamientos en comparación con otros diseños de células CAR-NK CD5 y en comparación con las células NK NT y en comparación con células CAR-NK CD19 irrelevantes.

[254] Las células CAR-NK CD5 con TM de DAP10 y dominio coestimulador de DAP10 muestran mayor aptitud metabólica en comparación con los otros diseños de construcción (Figuras 4A-4C), en base a un ensayo metabólico Seahorse que mide la tasa de consumo de oxígeno (OCR) y la tasa de

acidificación extracelular (ECAR) entre las diversas células CAR-NK CD5. En la Figura 4A, se compara la OCR entre los distintos diseños de células CAR-NK CD5 con las células NK no transducidas (NT). También se compara la ECAR entre los diversos diseños de células CAR-NK CD5 con las células NK no transducidas (NT) (Figura 4B). Estos datos demuestran una OCR significativamente mayor para las células CAR-NK CD5 con TM de DAP10 y dominios coestimuladores de DAP10 en comparación con otros diseños y en comparación con las células NT NK, además de la misma construcción con la mayor ECAR que les imparte una mayor aptitud metabólica.

[255] Las Figuras 5A-5C muestran que las células CAR-NK CD5 con dominio coestimulador de DAP10 mejoran el control tumoral en un modelo de ratón PDX con linfoma de células del manto CD5+. Se muestra el número absoluto de células CD45+CD5+ (en el tumor subcutáneo de los ratones que recibieron tumor solo (a la izquierda) respecto a tumor más CD5CAR-NK (a la derecha) en el tumor subcutáneo (Figura 5A). La Figura 5B provee un gráfico de barras que muestra el número absoluto de células CD45+CD5+ en el tumor subcutáneo de los ratones que recibieron tumor solo (izquierda) respecto a tumor más CD5CAR-NK (derecha) en el bazo. Se muestra el número absoluto de células CD45+CD5+ en el tumor subcutáneo de los ratones que recibieron tumor solo (izquierda) respecto a tumor más CD5CAR-NK (derecha) en la médula ósea (Figura 5C).

[256] Las Figuras 6A-6B demuestran que las células CAR-NK CD27 con el dominio coestimulador de DAP10 mejoran el control tumoral y la supervivencia en un modelo de ratón NSG con leucemia mieloide aguda (THP-1 transducidas con luciferasa de luciérnaga (FFLuc)). En la Figura 6A, se muestra una serie de

imágenes bioluminiscentes (BLI) que indican la carga tumoral como luminiscencia de THP-1 FFLuc entre los diversos grupos de ratones. Se provee una curva de supervivencia que muestra la supervivencia de los diversos grupos de ratones a lo largo del tiempo en la Figura 6B, que indica que el dominio coestimulador de DAP10 mejora la potencia *in vivo* de las células CAR-NK CD27.

EJEMPLO 2

SUPERIORIDAD DEL CAR CON BISAGRA DE CD28 - DOMINIO TRANSMEMBRANA DE CD28 – DOMINIO COESTIMULADOR DE DAP10

[257] El presente ejemplo se relaciona con construcciones de CAR particulares para su caracterización, incluyendo diversas construcciones que comprenden la bisagra de CD28, algunas que comprenden el dominio transmembrana de CD28, y algunas que comprenden el dominio coestimulador de DAP10. En una forma de realización particular, se provee actividad para una construcción de CAR que comprende la bisagra de CD28, el dominio transmembrana de CD28, y el dominio coestimulador de DAP10.

[258] La Figura 7A ilustra diversas identificaciones de construcciones y la correspondiente eficacia de transducción (Figura 7B). Se transdujeron células CB-NK con diversas construcciones de CAR CD5, como se muestra en la Figura 7A, y se midió la eficacia de transducción por citometría de flujo. La eficacia de transducción se basa en el porcentaje de células positivas (Figura 7B).

[259] La Figura 8 provee un ejemplo de un plan experimental para inyección en ratones con diversas construcciones de CD5 y una correspondiente línea de tiempo. El esquema muestra el ensayo de la actividad

antitumoral *in vivo* de diversas células CAR-NK CD5 contra la línea celular linfoblastoide T CCRF-CEM como diana.

[260] Las Figuras 9A y 9B muestran que los ratones tratados con células CAR-NK anti-CD5 con bisagra de IgG1 sobreviven significativamente más tiempo que con las células NK NT y el tumor solo. Las células CAR-NK CD5 redujeron la carga tumoral en un modelo de ratón de leucemia linfocítica aguda T. Se inyectaron células CCRF-CEM, transducidas con luciferasa de luciérnaga (FFLuc) en los ratones a razón de 1×10^5 /ratón, y se monitorearon por imágenes de bioluminiscencia para los diversos grupos. Los ratones del grupo de tratamiento se inyectaron con 3M de las respectivas células CAR-NK, 2 días después de la inyección tumoral. Las imágenes de bioluminiscencia (Figura 9A) de los ratones de cada grupo, y la cuantificación (Figura 9B) de la señal de luciferasa muestran que los ratones que recibieron las diversas NK CAR CD5 con bisagra de IgG1 mostraron mayor control del tumor CCRF-CEM en comparación con el tumor solo, las células NK NT pero sucumbieron al tumor un tiempo después debido a la falta de persistencia de las células NK.

[261] En las Figuras 10A y 10B se demuestra que los ratones tratados con células CAR-NK anti-CD5 con bisagra de CD28 reducen la carga tumoral significativamente en comparación con el tumor solo, las células NK NT y las células CAR-NK CD5 con bisagra de IgG1. Las células CAR-NK CD5 redujeron la carga tumoral en un modelo de ratón de leucemia linfocítica aguda T. Se inyectaron células CCRF-CEM, transducidas con luciferasa de luciérnaga (FFLuc) en los ratones a razón de 1×10^5 /ratón y estos se monitorearon por imágenes de bioluminiscencia para los diversos grupos. Los ratones del grupo de tratamiento se inyectaron con 3M de las respectivas células CAR-NK, 2 días

después de la inyección tumoral. Las imágenes de bioluminiscencia (Figura 10A) de los ratones de cada grupo, y la cuantificación (Figura 10B) de la señal de luciferasa muestran que los ratones que recibieron las diversas NK CAR CD5 con bisagra de CD28 mostraron mayor control del tumor CCRF-CEM en comparación con el tumor solo, las células NK NT y las células CAR-NK CD5 con bisagra de IgG1. Además, las células CAR-NK CD5 con dominio coestimulador de DAP10 mejoran el control tumoral significativamente en comparación con los otros dominios coestimuladores.

EJEMPLO 3

CÉLULAS CAR-NK CD5 CON SEÑALIZACIÓN POR DAP10 MUESTRAN UN PERFIL DE ALTA CAPACIDAD DE PROLIFERACIÓN, ACTIVIDAD METABÓLICA Y CARACTERÍSTICAS DE MEMORIA A NIVEL TRANSCRIPTÓMICO, EPIGENÉTICO Y PROTEÓMICO

[262] La construcción CAR CD5 que incluye el dominio transmembrana de CD28 (TM) y el dominio coestimulador de DAP10 con dominio de señalización de CD3z (CD28TMDAP10CD3ζ) se desempeña mejor que los otros ejemplos de construcciones de células CAR-NK CD5 que incorporan otras moléculas coestimuladoras, mostrando una actividad antitumoral superior *in vitro* e *in vivo*, mejor polifuncionalidad y aptitud metabólica, y menos agotamiento funcional después de múltiples reenfrentamientos tumorales *in vitro*. Para entender más por qué la señalización por DAP10 provee esta ventaja significativa a las células CAR-NK, los inventores realizaron secuenciación de ARN de célula individual (scRNAseq), secuenciación de ATAC de célula individual (scATACseq) y matrices proteicas de fase reversa (RPPA) comparando las células CAR-NK CD5 con señalización por DAP10-CD3ζ con las células CAR-

NK CD5 diseñadas sin dominio coestimulador (señalización CD3 ζ solamente) y con células NK no transducidas (NT) generadas a partir del mismo donante. Al nivel transcriptómico de célula individual, el análisis de enriquecimiento de vías de los datos de scRNAseq mostró que la señalización por DAP10 dota a las células CAR-NK de una capacidad proliferativa superior tal como se evidencia por el enriquecimiento de dianas de E2F y las vías de puntos de control de G2M, así como también la señalización por IL-2/STAT5 y la mayor actividad metabólica evidenciado por un enriquecimiento de vías metabólicas tales como Myc, mTORC1 y fosforilación oxidativa (Figura 11). A nivel epigenético, los datos de scATACseq muestran que las células CAR-NK CD5 con dominio de señalización DAP10-CD3 ζ muestran un enriquecimiento del complejo AP-1 y factores de transcripción BATF relacionados con la formación de memoria y la resistencia al agotamiento, respectivamente (Figura 12). A nivel proteómico, el análisis por enriquecimiento de vías de los datos de RPPA corroboró los resultados transcriptómicos que muestran que luego de la estimulación con el antígeno diana CD5, la señalización por DAP10 refuerza la capacidad de las células CAR-NK para proliferar y producir citoquinas (vías de proteínas ITGA e INSR), les provee potencial como células madre (vía de COPS5), aumenta su actividad metabólica tanto a nivel glicolítico como mitocondrial (vías de GAPDH y PARK7), aumenta su polarización de membrana y la capacidad para formar sinapsis inmunológicas con las células diana (vía de Cav1), las dota de potencial de memoria (vía de FOXM1) (Figura 13A y 13B).

EJEMPLO 4

LAS CÉLULAS CAR-NK CD5 CON SEÑALIZACIÓN POR DAP10 PERSISTEN Y MUESTRAN EVIDENCIA DE RESPUESTA DE MEMORIA *IN VIVO* DESPUÉS DEL REENFRENTAMIENTO TUMORAL.

[263] Se evaluaron las células CAR-NK para ver su capacidad para montar una respuesta de memoria *in vivo* después del reenfrentamiento tumoral. Se usó un modelo de ratón NSG bien establecido de CCRF-CEM, una línea celular T-ALL CD5+. La línea de células tumorales CCRF-CEM se transdujo con luciferasa de luciérnaga y GFP (CCRF-Ffluc-GFP) para poder monitorear el crecimiento tumoral por imágenes de bioluminiscencia (BLI) y por citometría de flujo, respectivamente. Se irradiaron los ratones (225cGy) en el día -1 y luego se inyectaron por vía intravenosa con 100.000 células tumorales CCRF-Ffluc por ratón en el día 0. En el día 2, el grupo de tratamiento recibió una inyección intravenosa de 5×10^6 células CAR-NK CD5 con señalización por DAP10. En el día 93 después de la inyección de células tumorales CCRF-CEM, se recolectó sangre para evaluar el porcentaje de células NK humanas (hCD45+CD56+GFP-). En el día 100, los ratones que se habían curado y no mostraban evidencia de tumor por BLI o por citometría de flujo fueron enfrentados nuevamente con 50.000 células tumorales CCRF-CEM. 1 semana más tarde (en el día 107), se recolectó sangre nuevamente para verificar el porcentaje de células célula NK humanas. Como se ve en las Figuras 14A y 14B, después del reenfrentamiento tumoral, el porcentaje de células NK humanas (hCD45+CD56+GFP-) en la sangre se incrementa de 13% a 91%, lo que indica que las células CAR-NK son capaces de montar una respuesta de memoria ante el reenfrentamiento tumoral *in vivo*.

REFERENCIAS

[264] Las siguientes referencias, en la medida en que proveen ejemplos de procedimientos u otros detalles suplementarios a los que se establecen en la presente, se incorporan específicamente a la presente a modo de referencia.

[265] 1. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, y col. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 2018;378(5):439-448.

[266] 2. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, y col. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 2017;377(26):2531-2544.

[267] 3. Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, y col. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 2019;380(1):45-56.

[268] 4. Hartmann J, Schussler-Lenz M, Bondanza A, Buchholz CJ. Clinical development of CAR T cells-challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts. *EMBO Mol Med*. 2017;9(9):1183-1197.

[269] 5. Daher M, Rezvani K. Next generation natural killer cells for cancer immunotherapy: the promise of genetic engineering. *Curr Opin Immunol*. 2018;51:146-153.

[270] 6. Mehta RS, Rezvani K. Chimeric Antigen Receptor Expressing Natural Killer Cells for the Immunotherapy of Cancer. *Front Immunol*. 2018;9:283.

[271] 7. . Liu E AS, Kerbaui L y col. GMP-compliant universal antigen presenting cells (uAPC) promote the metabolic fitness and antitumor activity of armored cord blood CAR-NK cell. *Front Immunol* doi: 103389/fimmu2021626098. 2021..

[272] Todos los métodos divulgados y reivindicados en la presente se pueden elaborar y practicar sin una excesiva experimentación a la luz de la presente divulgación. Aunque las composiciones y los métodos de esta invención se han descrito en términos de formas de realización preferidas, será evidente para las personas con experiencia en el arte que se pueden aplicar variaciones a los métodos y en los pasos o en la secuencia de pasos del método que se describe en la presente sin alejarse del concepto, espíritu y alcance de la invención. Más específicamente, resultará evidente que los agentes que se describen en la presente se pueden sustituir por ciertos agentes que están relacionados tanto químicamente como fisiológicamente consiguiendo resultados iguales o similares. Todos dichos sustitutos similares y modificaciones evidentes para las personas con experiencia en el arte deben considerarse dentro del espíritu, alcance y concepto de la invención tal como se define mediante las reivindicaciones adjuntas.