

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 875 005**

(51) Int. Cl.:

**A61K 35/15** (2015.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2017 E 19176141 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.03.2021 EP 3581190**

(54) Título: **Células asesinas naturales manipuladas y usos de las mismas**

(30) Prioridad:

**09.12.2016 US 201662432302 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.11.2021**

(73) Titular/es:

**ONK THERAPEUTICS LIMITED (100.0%)  
C/O Coll & Company Pier Road Barna Village  
Co. Galway H91 V6KV, IE**

(72) Inventor/es:

**O'DWYER, MICHAEL EAMON PETER**

(74) Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 875 005 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

5 Células asesinas naturales manipuladas y usos de las mismas

10 Campo de la invención

La presente invención se refiere a células asesinas naturales modificadas (NK) o líneas celulares NK útiles para tratar el cáncer, especialmente en el tratamiento de los cánceres de la sangre.

15 **Antecedentes de la invención**

Las células asesinas naturales (células NK) son linfocitos de sangre periférica que juegan un papel en la función inmune innata. Las células NK expresan una variedad de receptores de activación e inhibición que son responsables de discriminar entre células sanas y células infectadas por virus o células transformadas (cancerosas). A diferencia de las células T, las células NK ejercen su efecto citotóxico en las células diana de una manera independiente del antígeno. Como resultado, las células NK no requieren cebado de antígeno y pueden mostrar una citotoxicidad robusta en ausencia de antígeno específico.

20 Se han desarrollado recientemente receptores de antígeno químérico (CAR) para dirigir las células T citotóxicas a tipos de células y tejidos particulares. La mayoría de los CAR poseen un dominio de reconocimiento de antígeno derivado de un anticuerpo, y una porción transmembrana e intracelular derivada de una proteína de señalización inmune que está involucrada en la transducción de señal de células T, permitiendo así la activación de la función citotóxica de una célula T al unirse a un antígeno objetivo expresado en una población de células diana.

25 En mayor detalle, los CAR son receptores de antígeno recombinante que introducen una determinada especificidad de antígeno a una bcélula efectora inmune, en el caso de la presente invención, células NK. El CAR comprende una secuencia de polipéptidos definida expresada a partir de un polinucleótido exógeno que se ha introducido en la célula efectora inmune. Los receptores de antígeno químéricos comprenden una secuencia líder, un dominio de direccionamiento, un dominio transmembrana y uno o más dominios de señalización intracelular. De manera adecuada, el dominio de direccionamiento se deriva de una molécula de anticuerpo y comprende una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la molécula de anticuerpo que confieren especificidad de antígeno en el CAR. De manera adecuada, el dominio de direccionamiento del CAR para uso en las células NK manipuladas de esta invención es un fragmento variable de cadena única (scFv). Un scFv comprende la porción de cadena variable de una cadena ligera de inmunoglobulina y una molécula de cadena pesada de inmunoglobulina separada por un polipéptido conector flexible. El conector de polipéptido flexible permite que las cadenas pesada y ligera se asocien entre sí y reconstituyan un dominio de unión al antígeno de inmunoglobulina.

30 Existe la necesidad de terapias contra el cáncer alternativas y preferiblemente mejoradas que usen células NK-CAR.

35 Un objeto de la invención es proporcionar células NK-CAR y líneas celulares NK-CAR que son más eficaces en el tratamiento del cáncer que las terapias que dependen únicamente de las células NK. Realizaciones más particulares tienen como objetivo proporcionar tratamientos para cánceres identificados, por ejemplo, cánceres de la sangre, mientras se evitan problemas comunes con las terapias basadas en células, como el autodireccionamiento.

40 **Resumen de invención**

45 La presente invención proporciona células asesinas naturales (NK) que expresan receptores de antígeno químérico (CAR) para CD38, en donde el CAR tiene una afinidad por CD38 que es al menos un 25% menor que la afinidad de Daratumumab por CD38.

50 **Detalles de la invención**

55 La presente invención se define en las reivindicaciones. Las células NK de la presente invención son útiles en el tratamiento del cáncer, tanto tumores sólidos como cánceres hematológicos (de la sangre). También se describen métodos para uso y hacer lo mismo. Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento comprenden células NK primarias y líneas celulares NK, tales como KHYG-1, que expresan receptores de antígeno químérico. De manera adecuada, los CAR se dirigen a los antígenos asociados al cáncer. Por ejemplo, el antígeno asociado al cáncer puede comprender CD38, CD319/SLAMF-7, TNFRSF17/BCMA, SYND1/CD138, CD229, CD47, Her2/Neu, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), CD123/IL3-RA, CD19, CD20, CD22, Mesotelina, EpCAM, MUC1, MUC16, antígeno Tn, NEU5GC, NeuGcGM3, GD2, CLL-1 o HERV-K. En ciertas realizaciones específicas, el receptor de antígeno químérico puede ser específico para CD38. Opcionalmente, las células NK comprenden al menos otra modificación que da como resultado una mayor actividad citotóxica de la célula NK. De manera adecuada, la modificación comprende la eliminación o la expresión reducida de un inhibidor de punto de control, o la expresión incrementada de TRAIL o una variante TRAIL con mayor afinidad por un receptor TRAIL tal como DR4 o DR5. Ventajosamente, las células NK manipuladas de la presente invención muestran una expresión aumentada de ligandos de E-selectina, y/o una expresión reducida de receptores TRAIL tales como DR4, DR5, o

ambos. Estas células NK manipuladas pueden usarse para tratar a personas diagnosticadas con cáncer mediante transferencia adoptiva por vía intravenosa. Estas células NK pueden manipularse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica, que incluyen transducción viral o electroporación de polinucleótidos/vectores que expresan CAR y/o moléculas que activan la actividad citotóxica de una célula NK; tales como la proteína ligando inductora de apoptosis (TRAIL) relacionada con TNF variante; o por vectores que eliminan o reducen la expresión de receptores inhibitorios a través de un ARNsi, shRNA o un mecanismo de direccionamiento CRISPR/Cas9. Las células NK pueden ser células primarias o líneas celulares NK establecidas que retienen algunas de las funciones y características de las células NK primarias. En una realización específica, la línea celular NK manipulada es una célula KHYG-1, o una célula similar a KHYG-1 que posee cualidades distintas de la célula común como NK-92, como una alta expresión de ligando de E-selectina y una baja expresión de los receptores TRAIL DR4 y DR5. La transferencia adoptiva puede ser con células NK autólogas (singénicas) o heterólogas (alogénicas).

Se divulga una composición farmacéutica que comprende una célula asesina natural manipulada, en donde la célula asesina natural manipulada muestra un alto nivel de expresión de la superficie celular del ligando E-selectina, en donde la célula asesina natural manipulada comprende un receptor de antígeno químérico (CAR). En una determinada realización, la célula asesina natural manipulada comprende una pluralidad de células asesinas naturales manipuladas que son más del 25% positivas para un antígeno unido por el anticuerpo HECA-452. En una determinada realización, la célula asesina natural manipulada presenta un bajo nivel de expresión en la superficie celular de un receptor TRAIL, en donde el receptor TRAIL comprende TNFRSF10A (DR4) o TNFRSF10B (DR5). En una determinada realización, la célula asesina natural manipulada comprende una célula asesina natural manipulada principalmente. En cierta realización, la célula asesina natural manipulada comprende una línea de célula asesina natural transformada. En una determinada realización, la línea celular asesina natural modificada por ingeniería transformada es la línea celular NK-92 o la línea celular KHYG-1. En una determinada forma de realización, la línea celular asesina natural de ingeniería transformada es la línea celular KHYG-1. En una determinada realización, el CAR se une específicamente a un antígeno asociado al cáncer. En una determinada realización, el antígeno asociado al cáncer comprende CD38, CD319/SLAMF-7, TNFRSF17/BCMA, SYND1/CD138, CD229, CD47, Her2/Neu, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), CD123/IL3-RA, CD19, CD20, CD22, Mesotelina, EpCAM, MUC1, MUC16, antígeno Tn, NEU5GC, NeuGcGM3, GD2, CLL-1 o HERV-K. De manera adecuada, el antígeno asociado al cáncer comprende un antígeno asociado a cáncer de la sangre. De manera adecuada, el antígeno asociado a cáncer de la sangre comprende CD38, CD319/SLAMF-7, TNFRSF17/BCMA, SYND1/CD138, CD229, CD47, CD123/IL3-RA, CD19, CD20, CD22 o CLL-1. De manera adecuada, el antígeno asociado a cáncer de la sangre comprende CD38. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 80% idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 90% idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 95% idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 98% idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 90% idéntica a la establecida en SEQ ID NOs: 1 y 2. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 95% idéntica a que se establece en SEQ ID NO: 1 y 2. De manera adecuada, en donde el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 98% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 1 y 2. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de orientación que es idéntica a la establecida en las SEQ ID NO: 1 y 2. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de orientación que es al menos 90% idéntica a la establecida en las SEQ ID NO: 3 y 4. En una determinada realización, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direcciónamiento que es al menos 95% idéntica a la establecida en SEQ ID NOs: 3 y 4. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direcciónamiento que está en al menos 98% idéntico al establecido en SEQ ID NOs: 3 y 4. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direcciónamiento que es idéntica a la establecida en las SEQ ID NO: 3 y 4. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direcciónamiento que es al menos 90% idéntica a la establecida en la SEQ ID NO: 5 y 6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direcciónamiento que es al menos 95% idéntica a la establecida en las SEQ ID NO: 5 y 6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direcciónamiento que es al menos 98% idéntico al establecido en SEQ ID NOs: 5 y 6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direcciónamiento que es idéntica a la establecida en SEQ ID NOs: 5 y 6. De manera adecuada, el CAR comprende un polipéptido alfa CD8 humano. De manera adecuada, el CAR comprende un polipéptido DAP10, DAP12, 2B4 (CD244) o humano 4-1BB. De manera adecuada, el CAR comprende un polipéptido humano 4-1BB. De manera adecuada, el CAR comprende un polipéptido zeta CD3 humano. De manera adecuada, el CAR comprende un dominio de direcciónamiento que se deriva de un anticuerpo que exhibe una afinidad más baja por CD38 que el Daratumumab. En un aspecto adicional, la célula asesina natural manipulada comprende además un segundo receptor de antígeno químérico, el segundo receptor de antígeno químérico comprende CD38, CD319/SLAMF-7, TNFRSF17/BCMA, SYND1/CD138, CD229, CD47, Her2/Neu, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), CD123/IL3-RA, CD19, CD20, CD22, Mesotelina, EpCAM, MUC1, MUC16, antígeno Tn, NEU5GC, NeuGcGM3, GD2, CLL-1 o HERV-K. En un aspecto adicional, la célula asesina

natural manipulada comprende además un polipéptido de ligando inductor de apoptosis (TRAIL) mutante relacionado con TNF, en donde el polipéptido de TRAIL mutante induce una señalización aumentada o posee una mayor afinidad de unión a un ligando TRAIL. De manera adecuada, el ligando TRAIL comprende TNFRSF10A (DR4) o TNFRSF10B (DR5). De manera adecuada, el polipéptido TRAIL mutante comprende una mutación D269H/E195R de TRAIL humano. De manera adecuada, el polipéptido TRAIL mutante comprende una mutación G131R/N199R/K201H de TRAIL humano. De manera adecuada, el polipéptido CAR o el mutante TRAIL está integrado en el genoma de la célula asesina natural manipulada. De manera adecuada, la célula asesina natural manipulada comprende además una eliminación o reducción en la actividad de un receptor inhibidor de punto de control. De manera adecuada, el receptor inhibidor del punto de control comprende CD85d, CD85j, CD96, CD152, CD159a, CD223, CD279, CD328, SIGLEC9, TIGIT o TIM-3. De manera adecuada, el receptor inhibidor del punto de control comprende CD96, CD152 o CD328. De manera adecuada, el receptor inhibidor del punto de control comprende CD152. De manera adecuada, el receptor inhibidor del punto de control comprende CD328. De manera adecuada, el receptor inhibidor del punto de control se elimina total o parcialmente del genoma natural de la célula asesina, o se interrumpe por la inserción o eliminación de uno o más nucleótidos a nivel cromosómico. De manera adecuada, la célula asesina natural manipulada comprende un ARNsi que se dirige a un receptor inhibidor de punto de control. De manera adecuada, la composición farmacéutica comprende además un vehículo, estabilizador o excipiente farmacéuticamente aceptable. De manera adecuada, la composición farmacéutica está formulada para administración intraperitoneal. De manera adecuada, la composición farmacéutica está formulada para administración intraperitoneal. De manera adecuada, la composición farmacéutica es para uso en el tratamiento del cáncer. De manera adecuada, el cáncer comprende una leucemia, un linfoma o un mieloma. De manera adecuada, el cáncer comprende mieloma múltiple.

Se divulga un método para tratar un sujeto con cáncer que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende una célula asesina natural manipulada, en donde la célula asesina natural manipulada exhibe un alto nivel de expresión en la superficie celular del ligando de E-selectina, en donde la célula asesina natural manipulada comprende un receptor de antígeno químérico (CAR). En una determinada realización, la célula asesina natural manipulada comprende una pluralidad de células asesinas naturales manipuladas que son más del 25% positivas para un antígeno unido por el anticuerpo HECA-452. En una determinada realización, la célula asesina natural manipulada presenta un bajo nivel de expresión en la superficie celular de un receptor TRAIL, en donde el receptor TRAIL comprende TNFRSF10A (DR4) o TNFRSF10B (DR5). En una determinada realización, la célula asesina natural manipulada comprende una célula asesina natural manipulada principalmente. En cierta realización, la célula asesina natural manipulada comprende una línea de célula asesina natural transformada. En una determinada realización, la línea celular asesina natural modificada por ingeniería transformada es la línea celular NK-92 o la línea celular KHYG-1. En una determinada forma de realización, la línea celular asesina natural de ingeniería transformada es la línea celular KHYG-1. En una determinada realización, el CAR se une específicamente a un antígeno asociado al cáncer. En una determinada realización, el antígeno asociado al cáncer comprende CD38, CD319/SLAMF-7, TNFRSF17/BCMA, SYND1/CD138, CD229, CD47, Her2/Neu, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), CD123/IL3-RA, CD19, CD20, CD22, Mesotelina, EpCAM, MUC1, MUC16, antígeno Tn, NEU5GC, NeuGcGM3, GD2, CLL-1 o HERV-K. De manera adecuada, el antígeno asociado al cáncer comprende un antígeno asociado a cáncer de la sangre. De manera adecuada, el antígeno asociado a cáncer de la sangre comprende CD38, CD319/SLAMF-7, TNFRSF17/BCMA, SYND1/CD138, CD229, CD47, CD123/IL3-RA, CD19, CD20, CD22 o CLL. De manera adecuada, el antígeno asociado a cáncer de la sangre comprende CD38. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 80% idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 90% idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 95% idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 98% idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 90% idéntica a la establecida en SEQ ID NOs: 1 y 2. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 95% idéntica a que se establece en SEQ ID NO: 1 y 2. De manera adecuada, en donde el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 98% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 1 y 2. De manera adecuada, el CAR comprende un secuencia de aminoácidos del dominio de orientación que es idéntica a la establecida en las SEQ ID NO: 1 y 2. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de orientación que es al menos 90% idéntica a la establecida en las SEQ ID NO: 3 y 4. En una determinada realización, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 95% idéntica a la establecida en SEQ ID NOs: 3 y 4. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que está en al menos 98% idéntico al establecido en SEQ ID NOs: 3 y 4. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es idéntica a la establecida en las SEQ ID NO: 3 y 4. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 90% idéntica a la establecida en la SEQ ID NO: 5 y 6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 95% idéntica a la establecida en las SEQ ID NO: 5 y 6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es

al menos un 98% idéntico al establecido en SEQ ID NOs: 5 y 6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es idéntica a la establecida en las SEQ ID NO: 5 y 6. De manera adecuada, el CAR comprende un polipéptido alfa CD8. De manera adecuada, el CAR comprende un polipéptido DAP10, DAP12, 2B4 (CD244) o humano 4-1BB. De manera adecuada, el CAR comprende un polipéptido humano 4-1BB. De manera adecuada, el CAR comprende un polipéptido zeta CD3 humano. De manera adecuada, el CAR comprende un dominio de direccionamiento que se deriva de un anticuerpo que exhibe una afinidad más baja por CD38 que el Daratumumab. En un aspecto adicional, la célula asesina natural manipulada comprende además un segundo receptor de antígeno químérico, el segundo receptor de antígeno químérico comprende CD38, 5 CD319/SLAMF-7, TNFRSF17/BCMA, SYND1/CD138, CD229, CD47, Her2/Neu, receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), CD123/IL3-RA, CD19, CD20, CD22, Mesotelina, EpCAM, MUC1, MUC16, antígeno Tn, NEU5GC, NeuGcGM3, GD2, CLL-1 o HERV-K. En un aspecto adicional, la célula asesina natural manipulada comprende además un polipéptido de ligando inductor de apoptosis (TRAIL) mutante relacionado con TNF, en donde el polipéptido de TRAIL mutante induce una señalización aumentada o posee una mayor afinidad de unión a un ligando TRAIL. De 10 manera adecuada, el ligando TRAIL comprende TNFRSF10A (DR4) o TNFRSF10B (DR5). De manera adecuada, el polipéptido TRAIL mutante comprende una mutación D269H/E195R de TRAIL humano. De manera adecuada, el polipéptido TRAIL mutante comprende una mutación G131R/N199R/K201H de TRAIL humano. De manera adecuada, el polipéptido CAR o el mutante TRAIL está integrado en el genoma de la célula asesina natural manipulada. De 15 manera adecuada, la célula asesina natural manipulada comprende además una eliminación o reducción en la actividad de un receptor inhibidor de punto de control. De manera adecuada, el receptor inhibidor del punto de control comprende CD85d, CD85j, CD96, CD152, CD159a, CD223, CD279, CD328, SIGLEC9, TIGIT o TIM-3. De manera adecuada, el receptor inhibidor del punto de control comprende CD96, CD152 o CD328. De manera adecuada, el receptor inhibidor del punto de control comprende CD96. De manera adecuada, el receptor inhibidor del punto de control comprende CD152. De manera adecuada, el receptor inhibidor del punto de control comprende CD328. De 20 manera adecuada, el receptor inhibidor del punto de control se elimina total o parcialmente del genoma natural de la célula asesina, o se interrumpe por la inserción o eliminación de uno o más nucleótidos a nivel cromosómico. De manera adecuada, la célula asesina natural manipulada comprende un ARNsi que se dirige a un receptor inhibidor de punto de control. De manera adecuada, el receptor inhibidor del punto de control es eliminado del genoma de la célula asesina natural manipulada. De manera adecuada, la composición farmacéutica comprende un vehículo, estabilizador 25 o excipiente farmacéuticamente aceptable. De manera adecuada, la composición farmacéutica está formulada para administración intravenosa. De manera adecuada, la composición farmacéutica está formulada para administración intraperitoneal. De manera adecuada, el cáncer comprende una leucemia, un linfoma o un mieloma. De manera adecuada, el cáncer comprende mieloma múltiple. De manera adecuada, la composición farmacéutica se administra antes, durante o después de la administración de un inhibidor de proteasoma. De manera adecuada, la composición farmacéutica se administra antes, durante o después de un régimen de tratamiento de ciclofosfamida metronómica en 30 dosis bajas.

Se divulga un método para preparar una composición farmacéutica que comprende una célula asesina natural manipulada, en donde la célula asesina natural manipulada exhibe un alto nivel de expresión en la superficie celular 40 del ligando E-selectina, en donde la célula asesina natural manipulada comprende un receptor de antígeno químérico (CAR), en donde el método comprende incubar una célula asesina natural con un polinucleótido que codifica el CAR. De manera adecuada, el polinucleótido comprende un vector viral. De manera adecuada, el vector viral es un lentivirus. De manera adecuada, el vector viral es un retrovirus. De manera adecuada, el polinucleótido comprende ARNm. De manera adecuada, el polinucleótido está integrado en el genoma de la célula asesina natural manipulada. De manera 45 adecuada, la célula asesina natural manipulada se trata con un agente químico para aumentar la fucosilación de la célula asesina natural manipulada. De manera adecuada, la célula asesina natural manipulada comprende una pluralidad de células asesinas naturales manipuladas que son más del 25% positivas para un antígeno unido por el anticuerpo HECA-452. De manera adecuada, la célula asesina natural manipulada exhibe un bajo nivel de expresión en la superficie celular de un receptor TRAIL, en donde el receptor TRAIL comprende TNFRSF10A (DR4) o 50 TNFRSF10B (DR5). De manera adecuada, la célula asesina natural manipulada comprende una célula asesina natural primaria. De manera adecuada, la célula asesina natural manipulada comprende una línea celular asesina natural transformada. De manera adecuada, la línea celular asesina natural transformada es la línea celular NK-92 o la línea celular KHYG-1. De manera adecuada, la línea celular asesina natural transformada es la línea celular KHYG-1. De manera adecuada, el CAR se une específicamente a un antígeno asociado al cáncer. De manera adecuada, el antígeno asociado al cáncer comprende CD38, CD319/SLAMF-7, TNFRSF17/BCMA, SYND1/CD138, CD229, CD47, Her2/Neu, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), CD123/IL3-RA, CD19, CD20, CD22, Mesotelina, EpCAM, MUC1, MUC16, antígeno Tn, NEU5GC, NeuGcGM3, GD2, CLL-1 o HERV-K. De manera adecuada, el 55 antígeno asociado al cáncer comprende un antígeno asociado a cáncer de la sangre. De manera adecuada, el antígeno asociado a cáncer de la sangre comprende CD38, CD319/SLAMF-7, TNFRSF17/BCMA, SYND1/CD138, CD229, CD47, CD123/IL3-RA, CD19, CD20, CD22 o CLL-1. De manera adecuada, el antígeno asociado a cáncer de la sangre comprende CD38. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 80% idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 90% idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia 60 de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 95% idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 98% idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera

adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 90% idéntica a la establecida en SEQ ID NOs: 1 y 2.

5 De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 95% idéntica a que se establece en SEQ ID NO: 1 y 2. De manera adecuada, en donde el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 98% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 1 y 2. De manera adecuada, el CAR comprende un secuencia de aminoácidos del dominio de orientación que es idéntica a la establecida en las SEQ ID NO: 1 y 2. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de orientación que es al menos 90% idéntica a la establecida en las SEQ ID NO: 3 y 4. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 95% idéntica a la establecida en las SEQ ID NO: 3 y 4. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de orientación que es al menos 98% idéntico al establecido en SEQ ID NOs: 3 y 4.

10 De manera adecuada, el CAR comprende es una secuencia de aminoácidos del dominio de orientación que es idéntica a la establecida en las SEQ ID NO: 3 y 4. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de orientación que es al menos 90% idéntica a la establecida en las SEQ ID NO: 5 y 6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 95% idéntica a la establecida en SEQ ID NOs: 5 y 6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de orientación que es al menos 98% idéntica a la establecida en las SEQ ID NO: 5 y 6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de orientación que es idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 5 y 6. De manera adecuada, el CAR comprende un polipéptido alfa CD8 humano. De manera adecuada, el CAR comprende un polipéptido DAP10, DAP12, 2B4 (CD244) o humano 4-1BB. De manera adecuada, el CAR comprende un polipéptido humano 4-1BB. De manera adecuada, el CAR comprende un polipéptido zeta CD3 humano. De manera adecuada, el CAR comprende un dominio de direccionamiento que se deriva de un anticuerpo que exhibe una afinidad más baja por CD38 que el Daratumumab. En un aspecto adicional, la célula asesina natural manipulada comprende además un segundo receptor de antígeno químérico, el segundo receptor de antígeno químérico comprende CD38, CD319/SLAMF-7, TNFRSF17/BCMA, SYND1/CD138, CD229, CD47, Her2/Neu, receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), CD123/IL3-RA, CD19, CD20, CD22, Mesotelina, EpCAM, MUC1, MUC16, antígeno Tn, NEU5GC, NeuGcGM3, GD2, CLL-1 o HERV-K. En un aspecto adicional, la célula asesina natural manipulada comprende además un polipéptido de ligando inductor de apoptosis (TRAIL) mutante relacionado con TNF, en donde el polipéptido de TRAIL mutante induce una señalización aumentada o posee una mayor afinidad de unión a un ligando TRAIL. De manera adecuada, el ligando TRAIL comprende TNFRSF10A (DR4) o TNFRSF10B (DR5). De manera adecuada, el polipéptido TRAIL mutante comprende una mutación D269H/E195R de TRAIL humano. De manera adecuada, el polipéptido TRAIL mutante comprende una mutación G131R/N199R/K201H de TRAIL humano. De manera adecuada, el CAR o el polinucleótido TRAIL mutante se integra en el genoma de la célula asesina natural manipulada. De manera adecuada, el método comprende además incubar la célula asesina natural manipulada con un polinucleótido que elimina o reduce la actividad de un receptor inhibidor del punto de control. De manera adecuada, el receptor inhibidor del punto de control comprende CD85d, CD85j, CD96, CD152, CD159a, CD223, CD279, CD328, SIGLEC9, TIGIT o TIM-3. De manera adecuada, el receptor inhibidor del punto de control comprende CD96, CD152 o CD328. De manera adecuada, el receptor inhibidor del punto de control comprende CD96. De manera adecuada, el receptor inhibidor del punto de control comprende CD152. De manera adecuada, el receptor inhibidor del punto de control se elimina total o parcialmente del genoma natural de la célula asesina, o se interrumpe por la inserción o eliminación de uno o más nucleótidos a nivel cromosómico. De manera adecuada, la célula asesina natural manipulada comprende un ARNsi que se dirige a un receptor inhibidor de punto de control. De manera adecuada, el método comprende además mezclar la célula asesina natural manipulada con un vehículo, estabilizador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

45 En un cierto aspecto, descrito aquí, es una composición farmacéutica que comprende una célula asesina natural manipulada, en donde la célula asesina natural manipulada exhibe un alto nivel de expresión de la proteína FUT6 o FUT7, en donde la célula asesina natural manipulada comprende un químérico receptor de antígeno (CAR). De manera adecuada, la célula asesina natural manipulada comprende un polinucleótido exógeno que codifica la proteína FUT6 o FUT7. De manera adecuada, el CAR se une específicamente a un antígeno asociado al cáncer. De manera adecuada, el antígeno asociado al cáncer comprende CD38, CD319/SLAMF-7, TNFRSF17/BCMA, SYND1/CD138, CD229, CD47, Her2/Neu, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), CD123/IL3-RA, CD19, CD20, CD22, Mesotelina, EpCAM, MUC1, MUC16, antígeno Tn, NEU5GC, NeuGcGM3, GD2, CLL-1 o HERV-K. De manera adecuada, el antígeno asociado al cáncer comprende un antígeno asociado a cáncer de la sangre. De manera adecuada, el antígeno asociado a cáncer de la sangre comprende CD38, CD319/SLAMF-7, TNFRSF17/BCMA, SYND1/CD138, CD229, CD47, CD123/IL3-RA, CD19, CD20, CD22 o CLL-1. De manera adecuada, el antígeno asociado a cáncer de la sangre comprende CD38. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 80% idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 90% idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 95% idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 98% idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento

que es idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 90% idéntica a la establecida en SEQ ID NOS: 1 y 2. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 95% idéntica a que se establece en SEQ ID NO: 1 y 2. De manera adecuada, en donde el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 98% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 1 y 2. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es idéntica a la establecida en SEQ ID NOS: 1 y 2. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 90% idéntica a la establecida en SEC ID Nº: 3 y 4. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 95% idéntica a la establecida en la SEC ID Nº: 3 y 4. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 98% idéntico al establecido en SEQ ID NOS: 3 y 4. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es idéntica a la establecida en SEQ ID NOS: 3 y 4. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de orientación que es al menos 90% idéntica a la establecida en las SEQ ID NO: 5 y 6. De manera adecuada, la CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de orientación que es al menos 95% idéntica a la establecida en SEQ ID NOS: 5 y 6. De manera adecuada, el CAR comprende un dominio de orientación secuencia de aminoácidos que es al menos 98% idéntica a la establecida en SEQ ID NOS: 5 y 6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es idéntica a la establecida en SEQ ID NOS: 5 y 6. De manera adecuada, el CAR comprende un polipéptido alfa CD8 humano. De manera adecuada, el CAR comprende un dominio intracelular derivado de DAP10, DAP12, 2B4 (CD244) o el polipéptido humano 4-1BB. De manera adecuada, el CAR comprende un dominio intracelular derivado del polipéptido humano 4-1BB. De manera adecuada, el CAR comprende un dominio intracelular derivado del polipéptido zeta CD3 humano. De manera adecuada, el CAR comprende un dominio de direccionamiento que se deriva de un anticuerpo que exhibe una afinidad más baja por CD38 que el Daratumumab. En un aspecto adicional, la célula asesina natural manipulada comprende además un segundo receptor de antígeno quimérico, el segundo receptor de antígeno quimérico comprende CD38, CD319/SLAMF-7, TNFRSF17/BCMA, SYND1/CD138, CD229, CD47, Her2/Neu, receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), CD123/IL3-RA, CD19, CD20, CD22, Mesotelina, EpCAM, MUC1, MUC16, antígeno Tn, NEU5GC, NeuGcGM3, GD2, CLL-1 o HERV-K.

En un cierto aspecto, proporcionado aquí, es un método para tratar un sujeto con cáncer que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende una célula asesina natural manipulada, en donde la célula asesina natural manipulada exhibe un alto nivel de expresión del FUT6 o proteína FUT7, en donde la célula asesina natural manipulada comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR). De manera adecuada, la célula asesina natural manipulada comprende un polinucleótido exógeno que codifica la proteína FUT6 o FUT7. De manera adecuada, el CAR se une específicamente a un antígeno asociado al cáncer. De manera adecuada, el antígeno asociado al cáncer comprende CD38, CD319/SLAMF-7, TNFRSF17/BCMA, SYND1/CD138, CD229, CD47, Her2/Neu, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), CD123/IL3-RA, CD19, CD20, CD22, Mesotelina, EpCAM, MUC1, MUC16, antígeno Tn, NEU5GC, NeuGcGM3, GD2, CLL-1 o HERV-K. De manera adecuada, el antígeno asociado al cáncer comprende un antígeno asociado a cáncer de la sangre. De manera adecuada, el antígeno asociado a cáncer de la sangre comprende CD38, CD319/SLAMF-7, TNFRSF17/BCMA, SYND1/CD138, CD229, CD47, CD123/IL3-RA, CD19, CD20, CD22 o CLL-1. De manera adecuada, el antígeno asociado a cáncer de la sangre comprende CD38. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 80% idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 90% idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 95% idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 98% idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 90% idéntica a la establecida en SEQ ID NOS: 1 y 2. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 95% idéntica a que se establece en SEQ ID NOS: 1 y 2. De manera adecuada, en donde el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de orientación que es al menos 98% idéntica a la establecida en las SEQ ID NO: 1 y 2. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de orientación que es idéntica a la establecida en SEQ ID NOS: 1 y 2. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 90% idéntica a la establecida en SEQ ID NOS: 3 y 4. De manera adecuada, el CAR comprende un aminoácido del dominio de direccionamiento secuencia que es al menos 95% idéntica a la establecida en SEQ ID NOS: 3 y 4. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 98% idéntica a la establecida en SEQ ID NOS: 3 y 4. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es idéntica a la establecida en SEQ ID NOS: 3 y 4. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 90% idéntica a ese conjunto adelante en SEQ ID NOS: 5 y 6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio que es al menos un 95% idéntica a la establecida en las SEQ ID NO: 5 y 6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos un 98% idéntica a la establecida en la SEQ ID NO: 5

y 6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 5 y 6. De manera adecuada, el CAR comprende un polipéptido alfa CD8. De manera adecuada, el CAR comprende un polipéptido DAP10, DAP12, 2B4 (CD244) o humano 4-1BB. De manera adecuada, el CAR comprende un polipéptido humano 4-1BB. De manera adecuada, el CAR comprende un polipéptido zeta CD3 humano. De manera adecuada, el CAR comprende un dominio de direccionamiento que se deriva de un anticuerpo que exhibe una afinidad más baja por CD38 que el Daratumumab. En un aspecto adicional, la célula asesina natural manipulada comprende además un segundo receptor de antígeno quimérico, el segundo receptor de antígeno quimérico comprende CD38, CD319/SLAMF-7, TNFRSF17/BCMA, SYND1/CD138, CD229, CD47, Her2/Neu, receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), CD123/IL3-RA, CD19, CD20, CD22, Mesotelina, EpCAM, MUC1, MUC16, antígeno Tn, NEU5GC, NeuGcGM3, GD2, CLL-1 o HERV-K.

Preferentemente, las células NK que expresan CD38-CAR tienen una afinidad disminuida por las células normales (no malignas) que expresan CD38, en comparación con su afinidad por las células cancerosas que expresan CD38. Esto puede resultar, por ejemplo, porque las células cancerosas expresan niveles más altos de CD38 que las células normales y/o porque los CD38-CAR tienen una mayor afinidad por la forma específica de CD38 expresada en las células cancerosas y/o una menor afinidad por el específico forma de CD38 expresada en las células normales. Se prefiere que el aumento en la afinidad de la célula NK que expresa CD38-CAR por la célula cancerosa sea al menos 10%, al menos 20%, al menos 50%, más preferiblemente al menos 100%, en comparación con la afinidad de célula NK que expresa CD38-CAR para la célula normal. Se prefiere que la disminución de la afinidad de la célula NK que expresa CD38-CAR por la célula normal sea al menos 10%, al menos 20%, al menos 50%, más preferiblemente al menos 100%, en comparación con la afinidad de célula NK que expresa CD38-CAR para la célula cancerosa. Se prefiere que el aumento en la afinidad de la célula NK que expresa CD38-CAR por la célula cancerosa sea al menos 1.5 veces, al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 100 veces, más preferiblemente al menos 1000 veces mayor que la afinidad de la célula NK que expresa CD38-CAR por la célula normal. Se prefiere que la disminución de la afinidad de la célula NK que expresa CD38-CAR por la célula normal sea al menos 1.5 veces, al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 100 veces, más preferiblemente al menos 1000 veces más pequeño que la afinidad de la célula NK que expresa CD38-CAR por la célula cancerosa. Preferiblemente, las células NK que expresan CD38-CAR tienen baja afinidad por las células que expresan CD38 normales, en donde 'baja afinidad' se define como tener una afinidad lo suficientemente alta como para montar efectivamente una respuesta citotóxica contra las células cancerosas diana con una expresión aumentada (en relación con las células normales ) de CD38 (por ejemplo, células de mieloma múltiple), pero lo suficientemente bajo como para evitar el montaje de una respuesta citotóxica contra las células normales que expresan CD38.

En un cierto aspecto, proporcionado aquí, es un método para hacer una composición farmacéutica que comprende una célula asesina natural manipulada, en donde la célula asesina natural manipulada exhibe un alto nivel de expresión de la proteína FUT6 o FUT7, en donde la célula asesina natural manipulada comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el método comprende incubar una célula asesina natural con un polinucleótido que codifica el CAR. De manera adecuada, la célula asesina natural manipulada comprende un polinucleótido exógeno que codifica la proteína FUT6 o FUT7. De manera adecuada, el CAR se une específicamente a un antígeno asociado al cáncer. De manera adecuada, el antígeno asociado al cáncer comprende CD38, CD319/SLAMF-7, TNFRSF17/BCMA, SYND1/CD138, CD229, CD47, Her2/Neu, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), CD123/IL3-RA, CD19, CD20, CD22, Mesotelina, EpCAM, MUC1, MUC16, antígeno Tn, NEU5GC, NeuGcGM3, GD2, CLL-1 o HERV-K. De manera adecuada, el antígeno asociado al cáncer comprende un antígeno asociado a cáncer de la sangre. De manera adecuada, el antígeno asociado a cáncer de la sangre comprende CD38, CD319/SLAMF-7, TNFRSF17/BCMA, SYND1/CD138, CD229, CD47, CD123/IL3-RA, CD19, CD20, CD22 o CLL-1. De manera adecuada, el antígeno asociado a cáncer de la sangre comprende CD38. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 80% idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 90% idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 95% idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 98% idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 90% idéntica a la establecida en SEQ ID NOS: 1 y 2. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 95% idéntica a que se establece en SEQ ID NO: 1 y 2. De manera adecuada, en donde el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 98% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 1 y 2. De manera adecuada, el CAR comprende un secuencia de aminoácidos del dominio de orientación que es idéntica a la establecida en las SEQ ID NO: 1 y 2. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de orientación que es al menos 90% idéntica a la establecida en las SEQ ID NO: 3 y 4. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 95% idéntica a la establecida en las SEQ ID NO: 3 y 4. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 98% idéntico al establecido en SEQ ID NOS: 3 y 4. De manera adecuada, el CAR comprende es una secuencia de aminoácidos del dominio de orientación que es idéntica a la establecida en las SEQ ID NO: 3 y 4. De

manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de orientación que es al menos 90% idéntica a la establecida en las SEQ ID NO: 5 y 6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 95% idéntica a la establecida en las SEQ ID NO: 5 y 6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es al menos 98% idéntico al establecido en SEQ ID NOs: 5 y 6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos del dominio de direccionamiento que es idéntica a la establecida en SEQ ID NOs: 5 y 6. De manera adecuada, el CAR comprende un polipéptido alfa CD8 humano. De manera adecuada, el CAR comprende un polipéptido DAP10, DAP12, 2B4 (CD244) o humano 4-1BB. De manera adecuada, el CAR comprende un polipéptido zeta CD3 humano. De manera adecuada, el CAR comprende un dominio de direccionamiento que se deriva de un anticuerpo que exhibe una afinidad más baja por CD38 que el Daratumumab. En un aspecto adicional, la célula asesina natural manipulada comprende además un segundo receptor de antígeno químérico, el segundo receptor de antígeno químérico comprende CD38, CD319/SLAMF-7, TNFRSF17/BCMA, SYND1/CD138, CD229, CD47, Her2/Neu, receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), CD123/IL3-RA, CD19, CD20, CD22, Mesotelina, EpCAM, MUC1, MUC16, antígeno Tn, NEU5GC, NeuGcGM3, GD2, CLL-1 o HERV-K.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- La Figura 1A ilustra un esquema no limitante de un receptor de antígeno químérico de la presente invención. La figura no está representada a escala.
- La Figura 1B ilustra un esquema no limitante de un dominio de direccionamiento de un receptor de antígeno químérico de la presente invención. La figura no está representada a escala.
- Las Figuras 2A-B ilustran la unión del anticuerpo HECA-452 a las células KHYG-1 (A) y las células NK-92 (B) tal como se analizan por citometría de flujo.
- La Figura 3 ilustra la migración de células KHYG-1 a lo largo de un gradiente SDF-1 en comparación con las células NK-92.
- Las Figuras 4A-B ilustran una imagen fija de un vídeo que observa la migración de las células KHYG-1 (A) y las células NK-92 (B) en una cámara de flujo. Las células que se estancan o migran lentamente están marcadas con un asterisco.
- La Figura 5 ilustra una construcción de ARNg (vector de expresión) utilizada para dirigir la eliminación de CTLA4.
- La Figura 6 ilustra las bandas de electroforesis en gel para ADN LIR2 parental y mutado, antes y después de la transfección con CRISPR/Cas9 ARNg.
- La Figura 7 ilustra las bandas de electroforesis en gel para el ADN CTLA4 parental y mutado, antes y después de la transfección con CRISPR/Cas9 ARNg.
- Las Figuras 8A-B ilustran la eliminación de CD96 en células KHYG-1 usando ARNsí tal como se analiza por citometría de flujo. Se muestran dos experimentos independientes (A y B).
- La Figura 9 ilustra el aumento de la destrucción por las células KHYG-1 con la reducción de CD96 en diferentes relaciones efecto a objetivo.
- La Figura 10 ilustra la eliminación de CD328 en células KHYG-1 usando ARNsí tal como se analiza por citometría de flujo.
- La Figura 11 ilustra el aumento de la destrucción por las células KHYG-1 con reducción de CD328 en diferentes relaciones efecto a objetivo.
- La Figura 12 ilustra que las células KHYG-1 exhiben una expresión baja o ausente de TRAIL como se analiza por citometría de flujo.
- La Figura 13 ilustra la expresión incrementada de TRAIL en la superficie celular en células transfectadas con TRAIL de tipo salvaje y variante como se analiza por citometría de flujo.
- La Figura 14 ilustra la expresión incrementada de la superficie celular 107a en células transfectadas con TRAIL de tipo salvaje y variante como se analiza por citometría de flujo.
- La Figura 15 ilustra la viabilidad de las células KHYG-1 transfectadas con TRAIL de tipo salvaje o variante.

- La Figura 16 ilustra la expresión de receptores TRAIL en las diferentes líneas celulares NK; KHYG1 (cuatro superiores) y NK-92 (cuatro inferiores).
- 5 La Figura 17 ilustra el efecto que las células KHYG-1 que expresan TRAIL de tipo salvaje o TRAIL variante tienen sobre la apoptosis de las células K562.
- 10 La Figura 18 ilustra el efecto que las células KHYG-1 que expresan TRAIL de tipo salvaje o TRAIL variante tienen sobre la apoptosis de las células RPMI8226.
- 15 La Figura 19 ilustra el efecto que las células KHYG-1 que expresan TRAIL de tipo salvaje o TRAIL variante tienen sobre la apoptosis de las células MM1.S.
- 20 La Figura 20 ilustra gráficos de FACS de expresión DR5 en células RPMI8226 y células MM1.S, respectivamente, en donde se muestran los efectos del tratamiento con Bortezomib sobre la expresión DR5.
- 25 La Figura 21 ilustra dos gráficos FACS de apoptosis en células MM1.S pretratadas/no tratadas con Bortezomib cocultivadas con células KHYG-1 con (dos inferiores) o sin (dos intermedias) una variante TRAIL.
- 30 **DESCRIPCIÓN DETALLADA**
- Ciertas definiciones**
- 35 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Como se usa en esta especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Cualquier referencia a "o" en el presente documento pretende abarcar "y/o" a menos que se indique lo contrario.
- 40 Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se refiere a una cantidad que está cerca de la cantidad indicada, por ejemplo, en un 10%, 5% o 1%.
- 45 Como se usa en el presente documento, los términos "individuo", "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente e incluyen humanos diagnosticados o sospechosos de padecer cáncer u otra neoplasia.
- 50 En el presente documento, a menos que se indique lo contrario, las referencias a una célula NK o células NK abarcan tanto las líneas celulares NK como las células NK primarias.
- 55 Como se usa en el presente documento, el término "línea celular NK" se refiere a cualquier línea celular transformada o inmortalizada que retiene una o más propiedades de células asesinas naturales. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la una o más propiedades de las células asesinas naturales retenidas son la expresión de CD 56, la expresión del receptor similar a la inmunoglobulina de células asesinas (KIR) o la citotoxicidad independiente del antígeno contra una línea celular diana tal como las células K562. Las líneas celulares NK comunes son, por ejemplo, la línea celular NK-92 o KHYG-1.
- Células asesinas naturales**
- 60 Las células asesinas naturales manipuladas comprenden una o más manipulaciones que las distinguen de una célula asesina natural no manipulada. De manera adecuada, la célula asesina natural manipulada está manipulada para que comprenda un polinucleótido que codifica uno cualquiera o más de un receptor de antígeno químérico, una variante TRAIL, una proteína FUT6 o FUT 7, o comprende la eliminación o la expresión reducida de un inhibidor de punto de control. Las células asesinas naturales manipuladas (células NK) de la presente invención pueden fabricarse a partir de cualquier población de células NK incluyendo células primarias o líneas celulares establecidas. De manera adecuada, la célula NK es una célula NK humana. Las células asesinas naturales primarias en humanos expresan el marcador de superficie celular CD56, y en ciertas realizaciones, las células asesinas naturales manipuladas pueden producirse a partir de células positivas CD56 según se determina, a modo de ejemplo no limitante, mediante citometría de flujo. De manera adecuada, la célula asesina natural puede ser de una fuente autóloga (el mismo fondo genético

de la célula fuente y el receptor), o de una fuente heteróloga (diferente fondo genético de la célula fuente y el receptor). De manera adecuada, la célula NK se aísla de la sangre periférica de un donante o del individuo a tratar usando un método tal como clasificación celular o perlas magnéticas. Las células NK aisladas de un donante pueden expandirse ex vivo mediante el cultivo en interleucina-2 e interleucina-15 durante más de 7 días. Las células NK también se pueden diferenciar de las células madre o progenitoras en cultivos in vitro utilizando métodos conocidos en la técnica. De manera adecuada, la célula NK se diferencia de una célula madre derivada de médula ósea. De manera adecuada, la célula NK se diferencia de una célula adulta pluripotente. De manera adecuada, la célula NK se diferencia de una célula madre embrionaria.

Las células NK manipuladas también se pueden hacer a partir de una línea celular NK transformada. De manera adecuada, la línea celular NK transformada es una línea celular humana. Las líneas celulares NK comunes que se pueden usar son la línea celular NK-92 (disponible en ATCC; CRL-2497) o la línea celular KHYG-1. De manera adecuada, la línea celular NK manipulada está hecha de la línea celular KHYG-1. Véase Yagita et al., "A novel natural killer cell line (KHYG-1) from a patient with aggressive natural killer cell leukemia carrying a p53 point mutation". Leukemia 14(5): 922-30. A pesar de las similitudes entre las líneas celulares NK comunes, como la expresión de CD56, las diferentes líneas celulares poseen rasgos fenotípicos y genotípicos diferentes que pueden permitir una mayor idoneidad de una determinada línea celular NK en comparación con otras líneas celulares NK con respecto al desarrollo de una terapia basada en células (por ejemplo, células CAR NK o NK que expresan proteínas TRAIL variantes). De manera adecuada, la línea celular NK manipulada no comprende una línea celular o derivado NK-92.

En una determinada realización, descrita en el presente documento, las células NK manipuladas son útiles para tratar una neoplasia maligna hematológica. Para facilitar dicho tratamiento, en ciertas realizaciones, las células exhiben un aumento de la orientación hacia la médula ósea. De manera adecuada, las células NK manipuladas exhiben un alto nivel de expresión de ligando de E-selectina. La E-selectina también se conoce como: miembro de la familia similar a antígeno CD62 E (CD62E); molécula 1 de adhesión de leucocitos endoteliales (ELAM-1); o molécula 2 de adhesión celular endotelial leucocitaria (LECAM2). La E-selectina se une a los ligandos de E-selectina en la superficie de las células, que son glicoproteínas y/o glicolípidos que expresan el tetrasacárido Sialyl Lewis X (SLe<sup>x</sup>). SLe<sup>x</sup> se sintetiza por la acción combinada de α-fucosiltransferasas, α2-3-sialiltransferasas, β-galactosiltransferasas y N-acetyl-β-glucosaminiltransferasas. El anticuerpo HECA-452 reconoce los ligandos de E-selectina. De manera adecuada, las células NK manipuladas comprenden una población de células NK manipuladas que exhiben al menos 25%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95% o más células que se tiñen positivamente con el anticuerpo HECA-452. De manera adecuada, las células NK manipuladas comprenden una población de células NK que exhiben al menos 50% o más células que se tiñen positivamente con el anticuerpo HECA-452. De manera adecuada, las células NK manipuladas comprenden una población de células NK que exhiben al menos un 75% o más de células que se tiñen positivamente con el anticuerpo HECA-452. De manera adecuada, las células NK manipuladas comprenden una población de células NK que exhiben al menos 80% o más células que se tiñen positivamente con el anticuerpo HECA-452. De manera adecuada, las células NK manipuladas comprenden una población de células NK que exhiben al menos 90% o más células que se tiñen positivamente con el anticuerpo HECA-452. La positividad se puede evaluar, por ejemplo, tiñendo células in vitro con un anticuerpo HECA-452 conjugado fluorescentemente, y analizando la positividad mediante citometría de flujo comparando células teñidas con HECA-452 con células teñidas con control de isotypio. De manera adecuada, la población de células NK manipuladas que exhiben positividad para HECA-452 se han tratado químicamente para aumentar la fucosilación de las proteínas de la superficie celular. De manera adecuada, el tratamiento químico comprende el sustrato de GDP-fucosa y la enzima alfa 1,3 fucosiltransferasa-VI.

De manera adecuada, la célula NK manipulada está glicomanipulación. De manera adecuada, la célula NK manipulada exhibe un alto nivel de ligando E-selectina. De manera adecuada, se exhibe un alto nivel de ligando de E-selectina mediante un aumento de al menos 6 veces en la unión del anticuerpo HECA-452 en comparación con una unión del anticuerpo de control de isotypio. De manera adecuada, se exhibe un alto nivel de ligando de E-selectina por al menos un aumento de 7 veces en la unión del anticuerpo HECA-452 en comparación con una unión del anticuerpo de control de isotypio. De manera adecuada, se exhibe un alto nivel de ligando de E-selectina por al menos un aumento de 8 veces en la unión del anticuerpo HECA-452 en comparación con una unión del anticuerpo de control de isotypio. De manera adecuada, se exhibe un alto nivel de ligando de E-selectina por al menos un aumento de 9 veces en la unión del anticuerpo HECA-452 en comparación con una unión del anticuerpo de control de isotypio. De manera adecuada, se exhibe un alto nivel de ligando de E-selectina por al menos un aumento de 10 veces en la unión del anticuerpo HECA-452 en comparación con una unión del anticuerpo de control de isotypio. De manera adecuada, se exhibe un alto nivel de ligando de E-selectina por al menos un aumento de 20 veces en la unión del anticuerpo HECA-452 en comparación con una unión del anticuerpo de control de isotypio. De manera adecuada, se exhibe un alto nivel de ligando de E-selectina por al menos un aumento de 50 veces en la unión del anticuerpo HECA-452 en comparación con una unión del anticuerpo de control de isotypio. De manera adecuada, se muestra un alto nivel de ligando de E-selectina por al menos un aumento de 100 veces en la unión del anticuerpo HECA-452 en comparación con una unión del anticuerpo de control de isotypio. Este aumento en la unión puede analizarse, por ejemplo, comparando la intensidad de fluorescencia media de la unión del anticuerpo HECA-452 con la de un anticuerpo de control de isotypio usando citometría de flujo. De manera adecuada, la célula NK que exhibe un alto nivel de unión al anticuerpo HECA-452 es una línea celular KHYG-1. De manera adecuada, la población de células NK manipuladas que exhiben altos niveles de unión a HECA-452 se han tratado químicamente para aumentar la fucosilación o sialilación de proteínas de la superficie celular. De manera adecuada, el tratamiento químico comprende el sustrato de GDP-fucosa y la enzima alfa

5 1,3 fucosiltransferasa-VI. De manera adecuada, la célula NK ha sido manipulada para exhibir un alto nivel de unión al anticuerpo HECA-452 expresando FUT6, FUT7, o ambos. De manera adecuada, la expresión de FUT6 o FUT7 se logra mediante la introducción de ARNm o un plásmido de ADN o vector viral en una célula NK que muestra un bajo nivel de unión al anticuerpo HECA-452, por ejemplo, una célula NK-92. De manera adecuada, una línea celular NK inmortalizada, como las células NK-92, puede transfectarse de manera estable con un ácido nucleico que codifica FUT6, FUT7 o ambos. De manera adecuada, un alto nivel de expresión de FUT6 o FUT7 es al menos un aumento de 2, 5 o 10 veces en la expresión o actividad de FUT6 o FUT7 como se controla por ARNm, inmunotransferencia Western o ensayo enzimático. De manera adecuada, la célula NK manipulada expresa CD65. De manera adecuada, la célula NK manipulada expresa CD65.

10 De manera adecuada, las células NK manipuladas comprenden un bajo nivel de expresión en la superficie celular de un receptor TRAIL. De manera adecuada, el receptor TRAIL es DR4 o DR5. De manera adecuada, el bajo nivel de expresión en la superficie celular de un receptor TRAIL comprende una falta de actividad detectable del receptor TRAIL. De manera adecuada, el bajo nivel de expresión en la superficie celular del receptor TRAIL comprende un nivel marcado por la reactividad del anticuerpo anti-TRAIL que es comparable a un control de isotipo. De manera adecuada, el bajo nivel de expresión en la superficie celular del receptor TRAIL comprende un nivel marcado por la reactividad del anticuerpo anti-TRAIL que es inferior a 5 veces en comparación con un control de isotipo. De manera adecuada, el nivel bajo del receptor TRAIL de la superficie celular comprende un nivel marcado por la reactividad del anticuerpo anti-TRAIL que es menos de 2 veces en comparación con un control de isotipo. La expresión del receptor TRAIL de la superficie celular puede cuantificarse, por ejemplo, usando citometría de flujo como se detalla en los ejemplos.

#### Receptores de antígeno químérico

25 Un receptor de antígeno químérico (CAR) es un receptor de antígeno recombinante que está destinado a introducir una determinada especificidad de antígeno a una célula efectora inmune. El CAR comprende una secuencia de polipéptidos definida expresada a partir de un polinucleótido exógeno que se ha introducido en la célula efectora inmune, ya sea de forma transitoria o integrada en el genoma. Un esquema para un CAR genérico se ilustra en la Figura 1A. Los receptores de antígeno químérico comprenden una secuencia líder 101, un dominio de direccionamiento 102, un dominio transmembrana 103 y uno o más dominios de señalización intracelular (104 y 105). De manera adecuada, el dominio de direccionamiento se deriva de una molécula de anticuerpo y comprende una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la molécula de anticuerpo que confieren especificidad de antígeno en el CAR. De manera adecuada, el dominio de direccionamiento del CAR para uso en las células NK manipuladas de esta invención es un fragmento variable de cadena única (scFv) como se muestra en la Figura 1B.

30 35 Un scFv comprende la porción de cadena variable de una cadena ligera 106 de inmunoglobulina, y una molécula 108 de cadena pesada de inmunoglobulina separada por un polipéptido 107 conector flexible. El orden de las cadenas pesada y ligera no es limitante y puede invertirse. El conector de polipéptido flexible permite que las cadenas pesada y ligera se asocien entre sí y reconstituyan un dominio de unión al antígeno de inmunoglobulina. De manera adecuada, la región variable de la cadena ligera comprende tres CDR y la región variable de la cadena pesada comprende tres CDR. De manera adecuada, las CDR para uso en el dominio de direccionamiento se derivan de una molécula de anticuerpo de cualquier especie (por ejemplo, humano, ratón, rata, conejo, cabra, oveja) y las regiones marco entre las CDR se humanizan o comprenden una secuencia que es al menos 85%, 90%, 95 o 99% idénticos a una región marco humana.

40 45 50 55 60 Cuando el dominio de direccionamiento del CAR comprende un scFv, la cadena ligera de inmunoglobulina y la cadena pesada de inmunoglobulina se unen por enlaces de polipéptidos de varias longitudes. De manera adecuada, el conector de polipéptido comprende una longitud mayor o igual a 10 aminoácidos. De manera adecuada, el conector de polipéptido comprende una longitud mayor que 10, 15, 20 o 25 aminoácidos. De manera adecuada, el conector de polipéptido comprende una longitud menor o igual a 30 aminoácidos. De manera adecuada, el conector de polipéptido comprende una longitud inferior a 15, 20, 25 o 30 aminoácidos. De manera adecuada, el conector de polipéptido comprende entre 10 y 30 aminoácidos de longitud. De manera adecuada, el conector de polipéptido comprende entre 10 y 25 aminoácidos de longitud. De manera adecuada, el conector de polipéptido comprende entre 10 y 20 aminoácidos de longitud. De manera adecuada, el conector de polipéptido comprende entre 10 y 15 aminoácidos de longitud. De manera adecuada, el conector de polipéptido comprende entre 20 y 30 aminoácidos de longitud. De manera adecuada, el conector de polipéptido comprende entre 20 y 30 aminoácidos de longitud. De manera adecuada, el conector de polipéptido comprende entre 25 y 30 aminoácidos de longitud. De manera adecuada, el conector de polipéptido comprende aminoácidos hidrofílicos. De manera adecuada, el conector de polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos GSTSGSGKPGSGEGSTKG. De manera adecuada, el conector de polipéptido comprende una secuencia G4S (GGGS). El enlazador G4S permite flexibilidad y resistencia a la proteasa del enlazador. De manera adecuada, el conector G4S se repite consecutivamente en el conector polipéptido 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 veces.

65 Los CAR de esta invención comprenden además una secuencia 101 líder de NH<sub>2</sub>-terminal. La secuencia líder (también conocida como péptido señal) permite que la construcción CAR expresada entre en el retículo endoplásmico (ER) y se dirija a la superficie celular. La secuencia líder se escinde en el ER y la superficie celular madura CAR no posee una secuencia líder. En general, la longitud de la secuencia líder estará en el rango de 5 a 30 aminoácidos, y comprenderá un tramo de aminoácidos hidrófobos. De manera adecuada, la secuencia líder comprende más de 5, 10,

- 15, 20 o 25 aminoácidos de longitud. De manera adecuada, la secuencia líder comprende menos de 10, 15, 20, 25 o 30 aminoácidos de longitud. De manera adecuada, la secuencia líder comprende una secuencia derivada de cualquier proteína secretora. De manera adecuada, la secuencia líder comprende una secuencia derivada de la secuencia líder alfa CD8.
- 5 Los CAR de esta invención comprenden además un dominio transmembrana. Véase la Figura 1A, característica 103. El dominio transmembrana comprende residuos de aminoácidos hidrófobos y permite que el CAR se ancle en la membrana celular de la célula NK modificada. De manera adecuada, el dominio transmembrana comprende una secuencia de aminoácidos derivada de una proteína transmembrana. De manera adecuada, el dominio transmembrana comprende una secuencia de aminoácidos derivada del dominio transmembrana de la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD27, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 y CD154. De manera adecuada, el CAR comprende una transmembrana con una secuencia de aminoácidos derivada del dominio transmembrana de CD8. De manera adecuada, el CAR comprende un dominio transmembrana con una secuencia de aminoácidos derivada del dominio transmembrana del CD8 alfa humano.
- 10 Los CAR de esta invención comprenden además uno o más dominios de señalización intracelular. Véase la Figura 1A, características 104 y 105. El dominio de señalización intracelular aumenta la potencia del CAR y comprende un dominio de señalización intracelular derivado de una proteína implicada en la transducción de señal de células inmunes. De manera adecuada, el uno o más dominios de señalización intracelular comprenden un dominio de señalización intracelular derivado de CD3 zeta CD28, OX-40, 4-1BB, DAP10, DAP12, 2B4 (CD244), o cualquier combinación de los mismos. De manera adecuada, el uno o más dominios de señalización intracelular comprenden un dominio de señalización intracelular derivado de dos cualquiera de CD3 zeta CD28, OX-40, 4-1BB, DAP10, DAP12, 2B4 (CD244), o cualquier combinación de los mismos. De manera adecuada, el CAR comprende al menos dos dominios de señalización intracelular derivados de CD3 zeta y 4-1BB.
- 15 Los CAR de esta invención también pueden comprender una región de bisagra ubicada entre el dominio de direccionamiento y el dominio transmembrana. La región bisagra comprende aminoácidos hidrófilos y permite la flexibilidad del dominio de direccionamiento con respecto a la superficie celular. De manera adecuada, la región bisagra comprende más de 5, 10, 15, 20, 25 o 30 aminoácidos. De manera adecuada, la región bisagra comprende menos de 10, 15, 20, 25, 30 o 35 aminoácidos.
- 20 Se prefiere que el CD38 CAR de la presente invención tenga un dominio de unión que comprenda una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 7. Se prefiere que el dominio de unión a CD38 CAR comprende una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 28.
- 25 Se prefiere que el dominio de unión a CD38 CAR preferido de los ejemplos tiene un dominio de unión que comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 23.
- 30 Los CAR de esta invención también pueden comprender una región de bisagra ubicada entre el dominio de direccionamiento y el dominio transmembrana. La región bisagra comprende aminoácidos hidrófilos y permite la flexibilidad del dominio de direccionamiento con respecto a la superficie celular. De manera adecuada, la región bisagra comprende más de 5, 10, 15, 20, 25 o 30 aminoácidos. De manera adecuada, la región bisagra comprende menos de 10, 15, 20, 25, 30 o 35 aminoácidos.
- 35 Se prefiere que el dominio de unión a CD38 CAR comprenda una o más o todas las CDR de cadena pesada seleccionadas de SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 31. Opcionalmente, el CAR comprende uno o más o todas las CDR de cadena pesada seleccionadas de SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34.
- 40 Se prefiere que el dominio de unión a CD38 CAR comprenda una o más o todas las CDR de cadena ligera seleccionadas de SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 37, o SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 40.
- 45 Se prefiere que el dominio de unión a CD38 CAR comprenda una o más o todas las CDR de cadena ligera seleccionadas de SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 37, o SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 40.
- 50 Preferiblemente, los fragmentos y variantes de las cadenas pesadas y ligeras mencionadas anteriormente proporcionan dominios de unión a CAR con sustancialmente la misma actividad de unión a CD38, en donde los fragmentos incluyen péptidos que han sido truncados y/o han tenido aminoácidos eliminados y/o modificados. Se prefiere que cualquier fragmento/variante, de acuerdo con la invención, retenga al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, lo más preferiblemente al menos 90% de la actividad de unión del CAR preferido de los ejemplos. Se prefiere además que cualquier fragmento/variante, según la invención, tenga una actividad de unión que no exceda la actividad de unión del CAR preferido en más del 10%, más del 20%, más del 50%, preferiblemente no más de 100%.
- 55 Se prefiere que el dominio de unión a CD38 CAR comprenda una región variable de cadena pesada que tenga una homología de secuencia de al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, más preferiblemente al menos 90% con SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, el CD38 CAR comprende una región variable de cadena pesada que tiene una homología de secuencia de al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, más preferiblemente al menos 90% con SEQ ID NO: 7.
- 60 Se prefiere que el dominio de unión a CD38 CAR comprenda una región variable de cadena ligera que tenga una homología de secuencia de al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, más preferiblemente al menos 90% con SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 28.
- 65 Se prefiere que el dominio de unión a CD38 CAR comprenda una región variable de cadena ligera que tenga una homología de secuencia de al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, más preferiblemente al menos 90% con SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 28.

- 5 Se prefiere que el dominio de unión a CD38 CAR comprenda una o más o todas las CDR de cadena pesada que tengan una homología de secuencia de al menos 70%, al menos 80%, más preferiblemente al menos 90% con SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 31. Opcionalmente, el CD38 CAR comprende una o más o todas las CDR de cadena pesada que tienen una homología de secuencia de al menos 70%, al menos 80%, más preferiblemente al menos 90% con SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34.
- 10 Se prefiere que el dominio de unión a CD38 CAR comprenda una o más o todas las CDR de cadena ligera que tengan una homología de secuencia de al menos 70%, al menos 80%, más preferiblemente al menos 90% con SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 37, o SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 40.
- 15 Se prefiere que el CD38 CAR comprenda uno o más dominios coestimuladores seleccionados de SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 43. Se prefiere que el CAR comprenda un dominio coestimulador que tiene una homología de secuencia de al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, más preferiblemente al menos 90% con SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 43.
- 20 Se prefiere que el dominio de unión a CD38 CAR comprenda una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia que es un fragmento de SEQ ID NO: 1 que tiene al menos 60 aminoácidos, al menos 70 aminoácidos, al menos 80 aminoácidos, al menos 90 aminoácidos, al menos 100 aminoácidos, al menos 110 aminoácidos, más preferiblemente al menos 120 aminoácidos de longitud. Opcionalmente, el CD38 CAR comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia que es un fragmento de SEQ ID NO: 7 que tiene al menos 60 aminoácidos, al menos 70 aminoácidos, al menos 80 aminoácidos, al menos 90 aminoácidos, en al menos 100 aminoácidos, al menos 110 aminoácidos, más preferiblemente al menos 120 aminoácidos de longitud.
- 25 Se prefiere que el dominio de unión a CD38 CAR comprenda una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia que es un fragmento de SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 28 que es al menos 50 aminoácidos, al menos 60 aminoácidos, al menos 70 aminoácidos, al menos 80 aminoácidos, al menos 90 aminoácidos, más preferiblemente al menos 100 aminoácidos de longitud.
- 30 **Dominios de direccionamiento de CAR**
- 35 De manera adecuada, proporcionado aquí, un "antígeno asociado al cáncer" se refiere a un marcador molecular de cáncer que se expresa por una célula cancerosa en mayor medida que lo que se expresa por una célula normal. Los antígenos asociados al cáncer son generalmente proteínas o polipéptidos derivados de ellos, pero pueden ser glucanos, lípidos u otras moléculas orgánicas pequeñas. Además, un antígeno de cáncer puede surgir a través de aumentos o disminuciones en el procesamiento postraducción exhibido por una célula cancerosa en comparación con una célula normal, por ejemplo, glucosilación de proteínas, lipidación de proteínas, fosforilación de proteínas o acetilación de proteínas. Ejemplos no limitantes de un antígeno asociado al cáncer comprenden CD38, CD319/SLAMF-7, TNFRSF17/BCMA, SYND1/CD138, CD229, CD47, Her2/Neu, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), CD123/IL3-RA, CD19, CD20, CD22, Mesotelina, EpCAM, MUC1, MUC16, antígeno Tn, NEU5GC, NeuGcGM3, GD2, CLL-1, HERV-K.
- 40 De manera adecuada, proporcionado aquí, un "antígeno asociado a cáncer de la sangre" se refiere a un marcador molecular de cáncer que se expresa por una leucemia, linfoma, mieloma en un grado mayor que el expresado en una célula hematológica. Los antígenos asociados a cáncer de la sangre son generalmente proteínas o polipéptidos derivados de ellos, pero pueden ser glucanos, lípidos u otras moléculas orgánicas pequeñas. Además, un antígeno de cáncer de sangre puede surgir a través de aumentos o disminuciones en el procesamiento postraducción exhibido por una célula de leucemia, linfoma o mieloma en comparación con una célula normal, por ejemplo, glucosilación de proteínas, lipidación de proteínas, fosforilación de proteínas o acetilación de proteínas. Ejemplos no limitantes de un antígeno asociado a cáncer de la sangre comprenden CD38, CD319/SLAMF-7, TNFRSF17/BCMA, SYND1/CD138, CD229, CD47, CD123/IL3-RA, CD19, CD20, CD22, GD2, CLL-1, HERV-K. Ejemplos no limitantes de cánceres sanguíneos incluyen leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, linfoma difuso de células B grandes, linfoma folicular, linfoma de células del manto, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia de células pilosas, leucemia prolinfocítica de células T, mieloma múltiple, mieloma múltiple latente, mieloma de cadena ligera o leucemia linfocítica granular grande.
- 45 De manera adecuada, la célula NK manipulada comprende un CAR con un dominio de direccionamiento que se une específicamente a una proteína de la superficie celular. De manera adecuada, la célula NK manipulada comprende dos o más CARS con dominios de direccionamiento que se unen específicamente a dos o más proteínas distintas de la superficie celular. De manera adecuada, el dominio de direccionamiento CAR se une específicamente a un antígeno asociado al cáncer en la superficie celular de una célula cancerosa. De manera adecuada, el CAR se une específicamente a CD38, CD319/SLAMF-7, TNFRSF17/BCMA, SYND1/CD138, CD229, CD47, Her2/Neu, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), CD123/IL3-RA, CD19, CD20, CD22, Mesotelina, EpCAM, MUC1, MUC16, antígeno Tn, NEU5GC, NeuGcGM3, GD2, CLL-1, HERV-K.

El CD38, también conocido como ADP ribosa hidrolasa cíclica, es una glucoproteína de la superficie celular que se encuentra principalmente en las células inmunes. El CD38 está involucrado en la regulación del calcio intracelular y se sobreexpresa en muchos tipos de cáncer diferentes, como la leucemia, el mieloma y muchos tumores sólidos. De manera adecuada, las células NK manipuladas de la presente invención expresan un CAR con un dominio de direccionamiento 102 que es específico para CD38. De manera adecuada, el CD38 CAR comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80% idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, el CD38 CAR comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, el CD38 CAR comprende una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, el CD38 CAR comprende una secuencia de aminoácidos al menos 98% idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, el CD38 CAR comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, el CD38 CAR comprende una secuencia idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6.

De manera adecuada, la célula NK modificada expresa un CAR con un dominio de direccionamiento que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 1, y una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 2. De manera adecuada, el CAR comprende un secuencia de aminoácidos 80% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 1, y una secuencia de aminoácidos 80% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 2. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos 90% idéntica a esa establecido en SEQ ID NO: 1, y una secuencia de aminoácidos 90% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 2. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos 95% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 1, y una secuencia de aminoácidos 95% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 2. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos 98% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 1, y una secuencia de aminoácidos 98% idéntico al establecido en SEQ ID NO: 2. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos 99% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 1, un y una secuencia de aminoácidos 99% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 2. De manera adecuada, SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 se unen mediante un conector de polipéptido flexible. De manera adecuada, el conector de polipéptido flexible se une al terminal COOH del polipéptido establecido en la SEQ ID NO: 1 al terminal NH<sub>2</sub> del polipéptido establecido en la SEQ ID NO: 2. De manera adecuada, el conector flexible de polipéptido se une al terminal COOH del polipéptido establecido en la SEQ ID NO: 2 al extremo NH<sub>2</sub> del polipéptido establecido en la SEQ ID NO: 1.

De manera adecuada, la célula NK manipulada expresa un CAR con un dominio de direccionamiento que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3, y una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4. De manera adecuada, el CAR comprende un secuencia de aminoácidos 80% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 3, y una secuencia de aminoácidos 80% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 4. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos 90% idéntica a esa establecido en SEQ ID NO: 3, y una secuencia de aminoácidos 90% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 4. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos 95% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 3 , y una secuencia de aminoácidos 95% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 4. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos 98% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 3, y una secuencia de aminoácidos 98% idéntico al establecido en SEQ ID NO: 4. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos 99% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 3, un y una secuencia de aminoácidos 99% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 4. De manera adecuada, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 se unen mediante un conector de polipéptido flexible. De manera adecuada, el conector de polipéptido flexible se une al terminal COOH del polipéptido establecido en la SEQ ID NO: 3 al terminal NH<sub>2</sub> del polipéptido establecido en la SEQ ID NO: 4. De manera adecuada, el conector de polipéptido flexible se une al terminal COOH del polipéptido establecido en la SEQ ID NO: 4 al extremo NH<sub>2</sub> del polipéptido establecido en la SEQ ID NO: 3.

De manera adecuada, la célula NK manipulada expresa un CAR con un dominio de direccionamiento que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 5, y una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 6. De manera adecuada, el CAR comprende un secuencia de aminoácidos 80% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 5, y una secuencia de aminoácidos 80% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos 90% idéntica a esa establecido en SEQ ID NO: 5, y una secuencia de aminoácidos 90% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos 95% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 5, y una secuencia de aminoácidos 95% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos 98% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 5, y una secuencia de aminoácidos 98% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 6. De manera adecuada, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos 99% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 5, y una secuencia de aminoácidos 99% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 6. De manera adecuada, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 se unen mediante un conector de polipéptido flexible. De manera adecuada, el conector de polipéptido flexible se une al terminal COOH del polipéptido establecido en la SEQ ID NO: 5, al terminal NH<sub>2</sub> del polipéptido establecido en la SEQ ID NO: 6. De manera adecuada, el conector de polipéptido flexible se une al terminal COOH del polipéptido establecido en SEQ ID NO: 6 al extremo NH<sub>2</sub> del polipéptido establecido en SEQ ID NO: 5.

La célula NK manipulada de la presente invención puede comprender un CAR específico de CD38 que exhibe una afinidad que se ha sintonizado para una respuesta óptima al cáncer, mientras que también minimiza la reactividad a

CD38 que se expresa en células no cancerosas o no tumorales. El Daratumumab es un anticuerpo monoclonal que exhibe una alta afinidad por el receptor CD38. De manera adecuada, el CAR comprende un dominio de direccionamiento que se deriva de un anticuerpo que exhibe una afinidad más baja por CD38 que el Daratumumab.

5 De manera adecuada, el CAR comprende un dominio de direccionamiento que se deriva de un anticuerpo que exhibe una afinidad 25% menor por CD38 que el Daratumumab. De manera adecuada, el CAR comprende un dominio de direccionamiento que se deriva de un anticuerpo que exhibe una afinidad 50% menor por CD38 que el Daratumumab. De manera adecuada, el CAR comprende un dominio de direccionamiento que se deriva de un anticuerpo que exhibe una afinidad 2 veces menor por CD38 que el Daratumumab. La afinidad de anticuerpos se puede medir, por ejemplo, mediante el uso de resonancia de plasmón superficial (por ejemplo, Biacore).

10

### **CAR biespecíficos**

15 Las células NK manipuladas pueden ser biespecíficas, es decir, expresar CAR biespecíficos o CAR múltiples diferentes, en donde su afinidad es por dos ligandos/antígenos distintos. Los CAR-NK biespecíficos pueden usarse para aumentar el número de sitios de unión potenciales en las células cancerosas o, alternativamente, para localizar células cancerosas en otras células efectoras inmunes que expresan ligandos específicos para el NK-CAR. Para uso en la terapia contra el cáncer, un CAR biespecífico puede unirse a una célula tumoral objetivo y a una célula efectora, por ejemplo, una célula T, célula NK o macrófago. Así, por ejemplo, en el caso del mieloma múltiple, un CAR biespecífico puede unirse a un antígeno de células T (por ejemplo, CD3, etc.) y un marcador de células tumorales (por ejemplo, CD38, etc.). Un CAR biespecífico puede unirse alternativamente a dos marcadores de células tumorales separados, aumentando la afinidad de unión global de la célula NK por la célula tumoral objetivo. Esto puede reducir el riesgo de que las células cancerosas desarrollen resistencia regulando negativamente uno de los antígenos objetivo. Un ejemplo en este caso, en el mieloma múltiple, sería una unión CAR a CD38 y CS-1/SLAMF7. Otro marcador de células tumorales De manera adecuada dirigido por el CAR es un marcador de tipo "no me devore" en los tumores, exemplificado por CD47.

20

25

30 Las células NK manipuladas de la presente invención pueden comprender un CAR biespecífico o múltiples CAR expresados por la misma célula NK. Esto permite que las células NK apunten a dos antígenos diferentes simultáneamente. De manera adecuada, el CAR biespecífico tiene especificidad para cualquiera de los dos antígenos siguientes: CD38, CD319/SLAMF-7, TNFRSF17/BCMA, CD123/IL3-RA, SYND1/CD138, CD229, CD47, Her2/Neu, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), CD19, CD20, CD22, Mesotelina, EpCAM, MUC1, MUC16, antígeno Tn, NEU5GC, NeuGcGM3, GD2, CLL-1, CD123, HERV-K. De manera adecuada, la naturaleza biespecífica de la célula CAR NK puede permitir la unión a un antígeno tumoral y a otra célula inmune, como una célula T o una célula dendrítica. De manera adecuada, la naturaleza biespecífica de la célula CAR NK puede permitir la unión a un inhibidor de punto de control, como PDL-1 o CD47. De manera adecuada, el primer CAR tiene especificidad CD38, y el segundo CAR tiene especificidad para cualquiera de SLAMF-7, BCMA, CD138, CD229, PDL-1 o CD47. De manera adecuada, el primer CAR tiene especificidad para CD38, y el segundo CAR tiene especificidad para SLAMF-7, BCMA, CD138, CD229. De manera adecuada, el primer CAR tiene especificidad por CD38, y el segundo CAR tiene especificidad por SLAMF-7. De manera adecuada, el primer CAR tiene especificidad por CD38, y el segundo CAR tiene especificidad por BCMA. De manera adecuada, el primer CAR tiene especificidad por CD38, y el segundo CAR tiene especificidad por CD138. De manera adecuada, el primer CAR tiene especificidad por CD38, y el segundo CAR tiene especificidad por CD229.

35

40

### **Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF**

45 El ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL), también conocido como miembro de la superfamilia del ligando del factor de necrosis tumoral 10, es un ligando proteico que induce la muerte celular a través del inicio de la apoptosis. La apoptosis se inicia a través de la unión de TRAIL a los receptores TRAIL que se expresan en la superficie celular de muchos tipos diferentes de células, incluidas las células cancerosas. Las células NK manipuladas de la presente invención pueden expresar un polipéptido TRAIL variante que ha sido modificado de la secuencia de la proteína TRAIL de tipo salvaje por al menos un residuo de aminoácido para aumentar su afinidad de unión por los receptores inductores de muerte DR4, DR5 o ambos, mientras reduce la afinidad de unión por receptores señal, como DcR1 o DcR2. De manera adecuada, las células NK manipuladas expresan un polipéptido CAR y una variante TRAIL. De manera adecuada, la variante TRAIL muestra una mayor afinidad de unión a uno o más receptores TRAIL. De manera adecuada, la variante TRAIL muestra una mayor afinidad de unión al receptor TRAIL DR4. De manera adecuada, la variante TRAIL muestra una mayor afinidad de unión al receptor TRAIL DR5. De manera adecuada, la variante TRAIL muestra una mayor afinidad de unión al receptor TRAIL DR4 y DR5. Normalmente se sabe que el tipo salvaje TRAIL tiene un KD de >2 nM para DR4,>5 nM para DR5 y >20 nM para el receptor señal DcR1 (WO 2009/077857; medido por resonancia de plasmón superficial), o alrededor de 50 a 100 nM para DR4, 1 a 10 nM para DR5 y 175 a 225 nM para DcR1 (Truneh, A. et al. 2000; medido por calorimetría de titulación isotérmica y ELISA). Por lo tanto, una mayor afinidad por DR4 se define de manera adecuada como una KD de <2 nM o <5 nM, respectivamente, mientras que una mayor afinidad por DR5 se define de manera adecuada como una KD de <5 nM o <1 nM, respectivamente. Una afinidad reducida por el receptor señal DcR1 se define de manera adecuada como una KD de >50 nM o >225 nM, respectivamente. En cualquier caso, un aumento o disminución en la afinidad exhibida por la variante/mutante TRAIL es relativa a una afinidad de línea de base exhibida por TRAIL de tipo salvaje. De manera adecuada, la afinidad de la variante TRAIL por el receptor TRAIL aumenta al menos aproximadamente 10%,

50

55

60

65

15%, 20%, 25% o 50% en comparación con la exhibida por TRAIL de tipo salvaje. En una determinada realización, la variante TRAIL aumenta la apoptosis en comparación con el tipo salvaje, medida por la activación de la caspasa 8 en una célula objetivo. De manera adecuada, la variante TRAIL aumenta al menos 2 veces la activación de caspasa 8 en comparación con el tipo salvaje en una célula objetivo. De manera adecuada, la variante del receptor TRAIL comprende una mutación de aminoácidos del TRAIL humano que comprende D269H, S159R, E195R, G131R, N199R, K201H, o cualquier combinación de los mismos. De manera adecuada, la variante del receptor TRAIL comprende dos mutaciones de aminoácidos de TRAIL humano, D269H y E195R. De manera adecuada, la variante del receptor TRAIL comprende una mutación D269H. De manera adecuada, la variante del receptor TRAIL comprende una mutación E195R. De manera adecuada, la variante del receptor TRAIL comprende tres mutaciones de aminoácidos de TRAIL humano, G131R, N199R y K201H. De manera adecuada, el receptor TRAIL mutante se expresa en una línea primaria de células T o de células T. De manera adecuada, el receptor TRAIL está codificado por un polinucleótido que se ha transfectado en la línea de células T.

15 **Receptores inhibidores del punto de control**

Los receptores inhibidores del punto de control se expresan en la superficie de las células efectoras inmunes, tales como las células T y las células NK, y regulan negativamente la citotoxicidad de estas células. Ejemplos de receptores inhibidores del punto de control incluyen PD-1, CTLA-4 y CD96, todos los cuales se expresan en células NK. De manera adecuada, las células NK manipuladas comprenden una función del receptor inhibidor del punto de control reducido o ausente. De manera adecuada, los receptores inhibidores del punto de control con función reducida o ausente comprenden uno o más o todos de CD96 (TACTILE), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG-3), CD279 (PD-1), CD328 (SIGLEC7), SIGLEC9, TIGIT, y/o TIM-3. De manera adecuada, el receptor inhibidor del punto de control comprende uno o más de CD96 (TACTILE), CD152 (CTLA4) o CD328 (SIGLEC7). De manera adecuada, las células de células

NK comprenden una función del receptor inhibidor del punto de control reducido o ausente para dos o más receptores inhibidores del punto de control. De manera adecuada, los dos o más receptores inhibidores del punto de control comprenden CD96 (TACTILE), CD152 (CTLA4) o CD328 (SIGLEC7). De manera adecuada, las células NK exhiben una función del receptor inhibidor del punto de control reducido o ausente para tres receptores inhibidores del punto de control. De manera adecuada, los tres receptores inhibidores del punto de control comprenden CD96 (TACTILE), CD152 (CTLA4) o CD328 (SIGLEC7). De manera adecuada, la célula NK manipulada comprende un CD38 CAR, y la eliminación o reducción de un receptor inhibidor de punto de control. De manera adecuada, la célula NK manipulada comprende un CD38 CAR, una proteína TRAIL variante, y la eliminación o reducción de un receptor inhibidor del punto de control.

35 De manera adecuada, las células NK manipuladas se han modificado para reducir los receptores inhibitorios del punto de control mediante eliminación genética a través de un mecanismo CRISPR/Cas9 o TALEN. De manera adecuada, la célula NK manipulada comprende la eliminación genética de CD96 (TACTILE). De manera adecuada, la célula NK manipulada comprende la eliminación genética de CD328 (SIGLEC7). De manera adecuada, la célula NK manipulada comprende la eliminación genética de CD152 (CTLA4). De manera adecuada, la célula NK manipulada comprende la eliminación genética de CD279 (PD-1). De manera adecuada, la célula NK manipulada comprende la eliminación genética de dos o más de CD96 (TACTILE), CD328 (SIGLEC7), CD152 (CTLA4) o CD279 (PD-1). De manera adecuada, la célula NK manipulada comprende la eliminación genética de tres o más de CD96 (TACTILE), CD328 (SIGLEC7), CD152 (CTLA4) o CD279 (PD-1). De manera adecuada, las células NK manipuladas se han modificado para reducir la expresión del receptor inhibidor del punto de control por ARNs, shRNA o ARN antisentido. De manera adecuada, la célula NK manipulada comprende una expresión reducida de CD96 (TACTILE). De manera adecuada, la célula NK manipulada comprende una expresión reducida de CD328 (SIGLEC7). De manera adecuada, la célula NK manipulada comprende una expresión reducida de CD152 (CTLA4). De manera adecuada, la célula NK manipulada comprende una expresión reducida de CD279 (PD-1). De manera adecuada, la célula NK manipulada comprende una expresión reducida de dos o más de CD96 (TACTILE), CD328 (SIGLEC7), CD152 (CTLA4) o CD279 (PD-1). De manera adecuada, la célula NK manipulada comprende una expresión reducida de tres o más de CD96 (TACTILE), CD328 (SIGLEC7), CD152 (CTLA4) o CD279 (PD-1).

55 De manera adecuada, las células NK manipuladas que expresan un alto nivel de ligando de E-selectina evidenciado por la unión del anticuerpo HECA-452, como se detalla anteriormente, comprenden un CD38 CAR, un polipéptido variante TRAIL, o la eliminación o reducción de un punto de control receptor inhibidor de manera adecuada, las células NK manipuladas que expresan un alto nivel de ligando de E-selectina comprenden un CAR CD38 y un polipéptido variante TRAIL. De manera adecuada, las células NK manipuladas que expresan un alto nivel de ligando de E-selectina comprenden un CD38 CAR y la eliminación o reducción de un receptor inhibidor de punto de control. De manera adecuada, las células NK manipuladas que expresan un alto nivel de ligando de E-selectina comprenden un CAR CD38, un polipéptido variante TRAIL, y la eliminación o reducción de uno o más inhibidores del punto de control inhibidor del punto de control. De manera adecuada, el CD38 CAR comprende una secuencia de dominio de dirección al menos 80% idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, el CD38 CAR comprende una secuencia de dominio de dirección al menos 90% idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, el CD38 CAR comprende una secuencia al menos 95% idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, el CD38 CAR comprende una secuencia al menos 98% idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, el CD38 CAR comprende una secuencia al menos 99% idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6.

De manera adecuada, el CD38 CAR comprende una secuencia idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, la variante del receptor TRAIL comprende dos mutaciones de aminoácidos de TRAIL humano, D269H y E195R. De manera adecuada, la variante del receptor TRAIL comprende tres mutaciones de aminoácidos de TRAIL humano, G131R, N199R y K201H. De manera adecuada, la variante del receptor TRAIL comprende una mutación D269H. De manera adecuada, la variante del receptor TRAIL comprende una mutación E195R. De manera adecuada, los receptores inhibidores del punto de control son uno o más o todos de CD96 (TACTILE), CD 152 (CTLA4), CD223 (LAG-3), CD279 (PD-1), CD328 (SIGLEC7), SIGLEC9, TIGIT, y/o TIM-3.

10 De manera adecuada, las células NK manipuladas que expresan un alto nivel de ligando de E-selectina evidenciado por la unión del anticuerpo HECA-452 es una célula KHYG-1. De manera adecuada, la célula KHYG-1 comprende un CD38 CAR, un polipéptido variante TRAIL, o eliminación o reducción en la función de un receptor inhibidor del punto de control. De manera adecuada, la célula KHYG-1 comprende un CAR CD38 y un polipéptido variante TRAIL. De manera adecuada, la célula KHYG-1 comprende un CD38 CAR y una eliminación o reducción en la función de un receptor inhibidor del punto de control. De manera adecuada, la célula KHYG-1 comprende un CD38 CAR, un polipéptido variante TRAIL y eliminación o reducción en la función de un receptor inhibidor del punto de control. De manera adecuada, el CD38 CAR comprende una secuencia de dominio de direccionamiento al menos 80% idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, el CD38 CAR comprende una secuencia de dominio de direccionamiento al menos 90% idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, el CD38 CAR comprende una secuencia al menos 95% idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, el CD38 CAR comprende una secuencia al menos 98% idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, el CD38 CAR comprende una secuencia al menos 99% idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, el CD38 CAR comprende una secuencia idéntica a la establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. De manera adecuada, la variante del receptor TRAIL comprende dos mutaciones de aminoácidos de TRAIL humano, D269H y E195R. De manera adecuada, la variante del receptor TRAIL comprende tres mutaciones de aminoácidos de TRAIL humano, G131R, N199R y K201H. De manera adecuada, la variante del receptor TRAIL comprende una mutación D269H. De manera adecuada, la variante del receptor TRAIL comprende una mutación E195R. De manera adecuada, los receptores inhibidores del punto de control son uno o más o todos de CD96 (TACTILE), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG-3), CD279 (PD-1), CD328 (SIGLEC7), SIGLEC9, TIGIT y/o TIM-3.

15

20

25

30

#### **Métodos para hacer células asesinas naturales manipuladas**

Las células asesinas naturales manipuladas pueden hacerse usando varias técnicas diferentes conocidas en la técnica. De manera adecuada, la proteína variante CD38 CAR o TRAIL es codificada por un polinucleótido que se ha insertado en un vector viral. De manera adecuada, el vector viral comprende un adenovirus, un virus adenoasociado, un lentivirus o un retrovirus. De manera adecuada, el vector viral comprende un lentivirus o un retrovirus. De manera adecuada, el vector viral comprende un lentivirus. De manera adecuada, el vector viral comprende un retrovirus. El vector viral se puede usar para transducir células NK primarias o una línea celular NK. De manera adecuada, el vector viral se puede usar para transducir células NK primarias. De manera adecuada, el vector viral se puede usar para transducir una línea celular NK. De manera adecuada, el vector viral se puede usar para transducir células NK-92. De manera adecuada, el vector viral se puede usar para transducir células KHYG-1. De manera adecuada, las células pueden transfectarse transitoriamente usando cualquiera de los métodos descritos anteriormente, tales como electroporación, un vector viral o un reactivo de transfección basado en lípidos compatible con el uso in vivo.

45 De manera adecuada, la proteína variante CD38 CAR o TRAIL están codificadas por un polinucleótido. De manera adecuada, el polinucleótido es un plásmido de ADN o un polinucleótido de ADN linealizado. De manera adecuada, el polinucleótido es una molécula de ARNm. Cualquier de estos polinucleótidos se puede introducir en una población de células NK primarias o en una línea de células NK por electroporación. Por ejemplo, se puede utilizar la plataforma MaxCyte Flow Electroporation para generar las células NK manipuladas.

50 Las células asesinas naturales manipuladas que comprenden una eliminación o expresión reducida de un receptor inhibidor de punto de control se pueden hacer usando varias técnicas diferentes conocidas en la técnica. Los receptores pueden eliminarse o reducirse utilizando un mecanismo de direccionamiento CRISPR/Cas9 (utilizando un nucleótido de direccionamiento de ARNg). El ARNg se puede transfectar en células NK primarias o líneas celulares. De manera adecuada, el ARNg se transfecta en células NK primarias, o una población de células primarias, lo que da como resultado una expresión reducida del receptor inhibidor del punto de control en la población. De manera adecuada, el ARNg se transfecta en una línea celular NK. De manera adecuada, el ARNg es transfectado en una línea celular KHYG-1, y se seleccionan los clones que comprenden la eliminación homocigótica de un receptor inhibidor del punto de control.

#### **Métodos de administración de células asesinas naturales.**

65 Esta invención prevé composiciones farmacéuticas que comprenden formulaciones de células NK manipuladas adecuadas para la administración intravenosa a un sujeto. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una célula NK o una pluralidad de células NK que expresan un CAR; opcionalmente, la célula NK puede incluir una variante TRAIL o la eliminación de un inhibidor de punto de control. De manera adecuada, la célula NK que

expresa CAR está formulada con un vehículo, diluyente o excipiente aceptable para la administración. Dichas composiciones pueden comprender tampones tales como, por ejemplo, solución salina regulada neutra, solución salina normal o solución salina regulada con fosfato. De manera adecuada, la composición farmacéutica puede comprender un carbohidrato tal como glucosa, dextrosa, lactosa, galactosa, manosa, sacarosa o manitol. De manera adecuada, las composiciones farmacéuticas comprenden una proteína, polipéptidos o aminoácidos tales como glicina; De manera adecuada, las composiciones farmacéuticas comprenden estabilizadores y conservantes adicionales tales como antioxidantes; agentes quelantes como EDTA o EGTA, o glutatión. De manera adecuada, las células NK se expanden de un stock congelado conservado en glicerol a baja temperatura, como por debajo de -70°C. De manera adecuada, las células NK se expanden usando citoquinas como Interleucina-2 e interleucina-15, y se cultivan durante una semana o más.

De manera adecuada, las células NK y las líneas celulares que se administran se irradian con rayos gamma antes de la administración al individuo que recibe las células. De manera adecuada, las células se irradian para evitar que las células crezcan y se dividan in vivo. De manera adecuada, las células se irradian a dosis de al menos 5 Gy, 10 Gy, 20 Gy, 30 Gy, 40 Gy, 50 Gy o más. De manera adecuada, las células se irradian a una dosis de no más de 20 Gy, 30 Gy, 40 Gy, 50 Gy, 60 Gy. De manera adecuada, las células se tratan de manera que su vida media in vivo sea inferior a aproximadamente 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 días. De manera adecuada, las células y las líneas celulares comprenden un gen suicida que expresa una proteína que evita la división celular o es tóxica para las células, lo que permite una vida media acortada o que las células se destruyen tras la administración de un compuesto. Ejemplos de genes suicidas comunes incluyen herpes timidina quinasa y caspasa 9 inducible. Las células que comprenden un herpes timidina quinasa pueden destruirse usando antivirales antiherpes tales como aciclovir o ganciclovir.

Las células NK manipuladas que son objeto de esta invención pueden administrarse en una cantidad suficiente para prevenir el avance o inducir la remisión de un cáncer o neoplasia particular. De manera adecuada, las células NK manipuladas se administran en una cantidad mayor de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células/m<sup>2</sup>, aproximadamente  $1 \times 10^7$  células/m<sup>2</sup>, aproximadamente  $1 \times 10^8$  células/m<sup>2</sup>, aproximadamente  $1 \times 10^9$  células/m<sup>2</sup> y aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  células/m<sup>2</sup>. De manera adecuada, las células NK manipuladas se administran en una cantidad entre aproximadamente  $1 \times 10^6$  y aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  células/m<sup>2</sup>. De manera adecuada, las células NK manipuladas se administran en una cantidad entre aproximadamente  $1 \times 10^7$  y aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  células/m<sup>2</sup>. De manera adecuada, las células NK manipuladas se administran en una cantidad entre aproximadamente  $1 \times 10^8$  y aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  células/m<sup>2</sup>. De manera adecuada, las células NK manipuladas se administran en una cantidad entre aproximadamente  $1 \times 10^9$  y aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  células/m<sup>2</sup>. De manera adecuada, las células NK manipuladas se administran en una cantidad entre aproximadamente  $1 \times 10^7$  y aproximadamente  $1 \times 10^8$  células/m<sup>2</sup>. De manera adecuada, las células NK manipuladas se administran en una cantidad entre aproximadamente  $1 \times 10^8$  y aproximadamente  $1 \times 10^9$  células/m<sup>2</sup>. De manera adecuada, las células NK manipuladas pueden administrarse diariamente, semanalmente o mensualmente. De manera adecuada, las células se administran semanalmente durante dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce semanas o más. De manera adecuada, después de la administración semanal, las células NK manipuladas pueden administrarse mensualmente para mantenimiento. Las células pueden administrarse de una manera adecuada para el cáncer que se está tratando. Por ejemplo, para un cáncer hematológico, las células pueden administrarse por vía intravenosa. Por ejemplo, para un cáncer de tejido sólido, las células pueden administrarse por vía intratumoral o intraperitoneal.

#### 45 Adyuvantes de tratamiento

La administración de un adyuvante de tratamiento antes, con o después de la administración de una célula NK manipulada puede aumentar la eficacia del tratamiento. De manera adecuada, el adyuvante comprende interleucina-2 (IL-2), interleucina 8 (IL-8), interleucina-12 (IL-12), interleucina-15 (IL-15) o inhibidor de proteasoma. De manera adecuada, el inhibidor del proteasoma es bortezomib, carfilzomib, ixazomib o una combinación de los mismos. De manera adecuada, cualquiera de IL-2, IL-8, IL-12, IL-15 o un inhibidor de proteasoma se puede administrar a un paciente antes de la administración de una célula NK modificada. De manera adecuada, cualquiera de IL-2, IL-8, IL-12, IL-15 o un inhibidor de proteasoma puede administrarse a un paciente durante la administración de una célula NK modificada. De manera adecuada, cualquiera de IL-2, IL-8, IL-12, IL-15 o un inhibidor de proteasoma se puede administrar a un paciente después de la administración de una célula NK modificada. De manera adecuada, la actividad de IL-2, IL-8, IL-12, IL-15 puede ser suministrada por un agonista no interleucina para los receptores IL-2, IL8, IL-12 e IL-15. Por ejemplo, un agonista de interleucina-12 puede ser ALT-803 o ALT-801; un agonista de interleucina-15 puede ser NIZ985.

60 De manera adecuada, la célula NK manipulada puede incubarse con interleucina-12, interleucina-15 o inhibidor de proteasoma antes de la administración de la célula NK manipulada. De manera adecuada, la célula CD38 CAR NK puede incubarse con interleucina-12, interleucina-15 o bortezomib antes de la administración. De manera adecuada, la variante TRAIL de la célula NK puede incubarse con IL-2, IL-8, IL-12, IL-15 o un inhibidor de proteasoma antes de la administración. De manera adecuada, la incubación dura al menos 4, 6, 8, 12 o 24 horas.

65 Los métodos de tratamiento de la presente divulgación contemplan la administración de dosis bajas de ciclofosfamida como un adyuvante para mejorar el tratamiento con células NK manipuladas. La ciclofosfamida se puede administrar

por vía oral o intravenosa. De manera adecuada, la ciclofosfamida se administra de forma metronómica, por ejemplo, dosis bajas sostenidas de ciclofosfamida. De manera adecuada, la ciclofosfamida se administra por vía oral a una dosis de entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 25 mg al día o cada dos días durante una, dos, tres, cuatro o más semanas. De manera adecuada, la ciclofosfamida se administra por vía oral a una dosis de aproximadamente 50 mg al día durante una, dos, tres, cuatro o más semanas. De manera adecuada, la ciclofosfamida se administra por vía intravenosa a una dosis de entre aproximadamente 1000 mg y aproximadamente 250 mg por semana durante una, dos, tres, cuatro o más semanas. De manera adecuada, la ciclofosfamida se administra antes de la administración de células NK manipuladas y se suspende una vez que se administran las células NK manipuladas. De manera adecuada, la ciclofosfamida se administra para superponerse con la administración de células NK modificadas por uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis meses. De manera adecuada, la ciclofosfamida se administra simultáneamente con la administración de células NK manipuladas.

Los métodos de tratamiento contemplan la administración de un inhibidor de metaloproteasas como un adyuvante para mejorar el tratamiento con células NK manipuladas. De manera adecuada, el inhibidor de metaloproteasas es un antibiótico de tetraciclina tal como doxiciclina, minociclina, tigeciclina, demeclociclina, metaciclina, clortetraciclina, oxitetraciclina, llmeciclina, mecloclicina o rolitetraciclina. De manera adecuada, el antibiótico de tetraciclina es doxiciclina. De manera adecuada, los individuos a tratar con las células NK manipuladas de esta descripción se pretratan o se tratan simultáneamente con doxiciclina a una concentración de entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 300 mg por día, o en una concertación de entre aproximadamente 100 mg y 200 mg por día. La doxiciclina puede administrarse por vía oral o intravenosa. De manera adecuada, los individuos pueden ser tratados con doxiciclina simultáneamente con células NK manipuladas.

Los métodos de tratamiento de la presente invención prevén adyuvantes adicionales que sensibilizan las células a la muerte por las células NK manipuladas y pueden administrarse a un paciente con o por separado de las células NK manipuladas. Por ejemplo, una célula cancerosa puede ser resistente a la apoptosis inducida por TRAIL. De manera adecuada, el adyuvante es una molécula pequeña que restaura la sensibilidad a la apoptosis inducida por TRAIL. De manera adecuada, el compuesto es un mimético SMAC, por ejemplo, TL32711, LCL161, GDC-0917, HGS1029; un inhibidor de NF- $\kappa$ B, por ejemplo (-)-DHMEQ, PBS-1086, IT-603 o IT-901; un inhibidor de nedilación, por ejemplo MLN4924; un inhibidor de histona desacetilasa (HDAC), por ejemplo, panobinostat, vorinostat, romidepsin, chidamida, belinostat, ácido valproico, mocetinostat, abexinostat, etinostat, SB939, givinostat, quisinostat, resminostat. También se prevé un adyuvante de tratamiento que es un inhibidor de una proteína inhibidora de la apoptosis, por ejemplo: un inhibidor de BCL-2, por ejemplo, venetoclax (ABT-199) u obatoclax (GX15-070); un inhibidor de survivina, por ejemplo, YM15 o shepherdina. De manera adecuada, el adyuvante se administra antes de la administración de la célula NK modificada. De manera adecuada, el adyuvante se administra simultáneamente con la administración de la célula NK modificada.

#### **40 Indicaciones terapéuticas**

Las células asesinas naturales manipuladas que expresan CD38 CAR de la presente invención son útiles para el tratamiento terapéutico del cáncer. De manera adecuada, el cáncer comprende un cáncer hematológico (de la sangre). De manera adecuada, el cáncer hematológico comprende mieloma múltiple, mieloma múltiple latente o mieloma de cadena ligera. De manera adecuada, el cáncer hematológico es una leucemia. De manera adecuada, la leucemia comprende leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia de células peludas, leucemia prolinfocítica de células T o leucemia linfocítica granular grande.

De manera adecuada, el cáncer por tratar es un tumor de tejido sólido. De manera adecuada, el tumor de tejido sólido es un tumor hepático, que incluye carcinoma hepatocelular; un tumor pulmonar; cáncer de pulmón de células no pequeñas; un tumor pancreático, que incluye adenocarcinoma pancreático o carcinoma de células acinares del páncreas; un cáncer de colon; cáncer de estómago; cáncer de riñón, incluido el carcinoma de células renales (CCR) y el carcinoma de células de transición (CCT, también conocido como carcinoma de células uroteliales); cáncer de ovarios; cáncer de próstata; cáncer de mama; o cáncer cervical.

#### **55 CAR en general**

De manera adecuada, descrito aquí, son células NK manipuladas. De manera adecuada, la célula NK manipulada exhibe un alto nivel de ligando E-selectina. De manera adecuada, la célula NK manipulada que exhibe un alto nivel de unión al ligando de E-selectina exhibe un nivel de unión HECA-452 mayor que el de una célula NK-92. De manera adecuada, la célula NK manipulada comprende un receptor de antígeno químérico. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno químérico, además comprende una molécula TRAIL humana variante. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno químérico, además comprende una molécula TRAIL humana variante, en donde la molécula TRAIL humana variante comprende tres mutaciones de aminoácidos; G131R, N199R y K201H. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno químérico, además comprende una molécula TRAIL humana variante, en donde la molécula TRAIL humana variante comprende dos mutaciones de aminoácidos; D269H y E195R. De manera adecuada, la célula

NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de una molécula inhibidora de punto de control. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD96 (TACTILE). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD328 (SIGLEC7). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CTLA-4. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD279 (PD-1). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de al menos dos inhibidores de punto de control seleccionados de CD96 (TACTILE), CD328 (SIGLEC7), CTLA-4 y CD279 (PD-1).

#### Antígenos asociados al cáncer

De manera adecuada, como se describe en el presente documento, se manipulan células NK. De manera adecuada, la célula NK manipulada exhibe un alto nivel de ligando E-selectina. De manera adecuada, la célula NK manipulada que exhibe un alto nivel de ligando de E-selectina exhibe un nivel de unión HECA-452 mayor que el de una célula NK-92. De manera adecuada, la célula NK modificada por ingeniería comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a un antígeno asociado al cáncer. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a un antígeno asociado al cáncer, además comprende una molécula TRAIL humana variante. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a un antígeno asociado al cáncer, además comprende una molécula TRAIL humana variante, en donde la molécula TRAIL humana variante comprende tres mutaciones de aminoácidos; G131R, N199R y K201H. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a un antígeno asociado al cáncer, además comprende una molécula TRAIL humana variante, en donde la molécula TRAIL humana variante comprende dos mutaciones de aminoácidos; D269H y E195R. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a un antígeno asociado al cáncer y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de una molécula inhibidora del punto de control. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a un antígeno asociado al cáncer y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD96 (TACTILE). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a un antígeno asociado al cáncer y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD328 (SIGLEC7). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a un antígeno asociado al cáncer, y una molécula TRAIL humana variante, comprende además la eliminación o reducción en la expresión de CTLA-4. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a un antígeno asociado al cáncer y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD279 (PD-1). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a un antígeno asociado al cáncer y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de al menos dos inhibidores de punto de control seleccionados de CD96 (TACTILE), CD328 (SIGLEC7), CTLA-4 y CD279 (PD-1).

#### Antígenos asociados a cáncer de la sangre

De manera adecuada, como se describe en el presente documento, se manipulan células NK. De manera adecuada, la célula NK manipulada exhibe un alto nivel de ligando E-selectina. De manera adecuada, la célula NK manipulada que exhibe un alto nivel de unión al ligando de E-selectina exhibe un nivel de unión HECA-452 mayor que el de una célula NK-92. De manera adecuada, la célula NK manipulada comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a un antígeno asociado a cáncer de la sangre. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a un antígeno asociado a cáncer de la sangre, además comprende una molécula TRAIL humana variante. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a un antígeno asociado a cáncer de la sangre, comprende además una molécula TRAIL humana variante, en donde la molécula TRAIL humana variante comprende tres mutaciones de aminoácidos; G131R, N199R y K201H. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a un antígeno asociado a cáncer de la sangre, comprende además una molécula TRAIL humana variante, en donde la molécula TRAIL humana variante comprende dos mutaciones de aminoácidos; D269H y E195R. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a un antígeno asociado a cáncer de la sangre y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de una molécula inhibidora del punto de control. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a un antígeno asociado a cáncer de la sangre y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD96 (TACTILE). De

manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a un antígeno asociado a cáncer de la sangre y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD328 (SIGLEC7). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a un antígeno asociado a cáncer de la sangre, y una molécula TRAIL humana variante, comprende además la eliminación o reducción en la expresión de CTLA-4. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a un antígeno asociado a cáncer de la sangre y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD279 (PD-1). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a un antígeno asociado a cáncer de la sangre y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de al menos dos inhibidores de punto de control seleccionados de CD96 (TACTILE), CD328 (SIGLEC7), CTLA-4 y CD279 (PD-1).

15 **CD319**

De manera adecuada, como se describe en el presente documento, se manipulan células NK. De manera adecuada, la célula NK manipulada exhibe un alto nivel de ligando E-selectina. De manera adecuada, la célula NK manipulada que exhibe un alto nivel de ligando de E-selectina exhibe un nivel de unión HECA-452 mayor que el de una célula NK-92. De manera adecuada, la célula NK manipulada comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD319/SLAMF-7. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD319/SLAMF-7, además comprende una molécula TRAIL humana variante. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD319/SLAMF-7, además comprende una molécula TRAIL humana variante, en donde la molécula TRAIL humana variante comprende tres mutaciones de aminoácidos; G131R, N199R y K201H. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD319/SLAMF-7, además comprende una molécula TRAIL humana variante, en donde la molécula TRAIL humana variante comprende dos mutaciones de aminoácidos; D269H y E195R. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD319/SLAMF-7 y una molécula TRAIL humana variante, comprende además la eliminación o reducción en la expresión de una molécula inhibidora del punto de control. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD319/SLAMF-7 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD96 (TACTILE). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD319/SLAMF-7 y una molécula TRAIL humana variante, comprende además la eliminación o reducción en la expresión de CD328 (SIGLEC7). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD319/SLAMF-7 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CTLA-4. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD319/SLAMF-7 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD279 (PD-1). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD319/SLAMF-7 y una molécula de TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de al menos dos inhibidores de punto de control seleccionados de CD96 (TACTILE), CD328 (SIGLEC7), CTLA-4 y CD279 (PD-1).

45 **TNFRSF17**

De manera adecuada, como se describe en el presente documento, se manipulan células NK. De manera adecuada, la célula NK manipulada exhibe un alto nivel de ligando E-selectina. De manera adecuada, la célula NK manipulada que exhibe un alto nivel de ligando E-selectina HECA exhibe un nivel de unión HECA-452 mayor que el de una célula NK-92. De manera adecuada, la célula NK manipulada comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a TNFRSF17/BCMA. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a TNFRSF17/BCMA, además comprende una molécula TRAIL humana variante. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a TNFRSF17/BCMA, además comprende una molécula TRAIL humana variante, en donde la molécula TRAIL humana variante comprende tres mutaciones de aminoácidos; G131R, N199R y K201H. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a TNFRSF17/BCMA, además comprende una molécula TRAIL humana variante, en donde la molécula TRAIL humana variante comprende dos mutaciones de aminoácidos; D269H y E195R. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a TNFRSF17/BCMA y una molécula TRAIL humana variante, comprende además la eliminación o reducción en la expresión de una molécula inhibidora del punto de control. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a TNFRSF17/BCMA y una molécula TRAIL humana variante, comprende además la eliminación o reducción en la expresión de CD96 (TACTILE). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a TNFRSF17/BCMA y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD328 (SIGLEC7). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a TNFRSF17/BCMA y una molécula TRAIL humana variante, además

comprende la eliminación o reducción en la expresión de CTLA-4. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a TNFRSF17/BCMA y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD279 (PD-1). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a TNFRSF17/BCMA y una molécula de TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de al menos dos inhibidores de punto de control seleccionados de CD96 (TACTILE), CD328 (SIGLEC7), CTLA-4 y CD279 (PD-1).

#### 10 **CD123**

De manera adecuada, como se describe en el presente documento, se manipularon células NK. De manera adecuada, la célula NK manipulada exhibe un alto nivel de ligando E-selectina. De manera adecuada, la célula NK manipulada que exhibe un alto nivel de ligando de E-selectina exhibe un nivel de unión HECA-452 mayor que el de una célula NK-92. De manera adecuada, la célula NK manipulada comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD123/IL3-RA. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD123/IL3-RA, además comprende una molécula TRAIL humana variante. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD123/IL3-RA, además comprende una molécula TRAIL humana variante, en donde la molécula TRAIL humana variante comprende tres mutaciones de aminoácidos; G131R, N199R y K201H. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD123/IL3-RA, además comprende una molécula TRAIL humana variante, en donde la molécula TRAIL humana variante comprende dos mutaciones de aminoácidos; D269H y E195R. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD123/IL3-RA y una molécula TRAIL humana variante, comprende además la eliminación o reducción en la expresión de una molécula inhibidora del punto de control. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD123/IL3-RA y una molécula TRAIL humana variante, comprende además la eliminación o reducción en la expresión de CD96 (TACTILE). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD123/IL3-RA y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD328 (SIGLEC7). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD123/IL3-RA y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CTLA-4. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD123/IL3-RA y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD279 (PD-1). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD123/IL3-RA y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de al menos dos inhibidores de punto de control seleccionados de CD96 (TACTILE), CD328 (SIGLEC7), CTLA-4 y CD279 (PD-1).

#### 40 **CD138**

De manera adecuada, como se describe en el presente documento, se manipularon células NK. De manera adecuada, la célula NK manipulada exhibe un alto nivel de ligando E-selectina. De manera adecuada, la célula NK manipulada que exhibe un alto nivel de ligando de E-selectina exhibe un nivel de unión HECA-452 mayor que el de una célula NK-92. De manera adecuada, la célula NK manipulada comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a SYND1/CD138. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a SYND1/CD138, además comprende una molécula TRAIL humana variante. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a SYND1/CD138, además comprende una molécula TRAIL humana variante, en donde la molécula TRAIL humana variante comprende tres mutaciones de aminoácidos; G131R, N199R y K201H. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a SYND1/CD138, además comprende una molécula TRAIL humana variante, en donde la molécula TRAIL humana variante comprende dos mutaciones de aminoácidos; D269H y E195R. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a SYND1/CD138 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de una molécula inhibidora de punto de control. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a SYND1/CD138 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD96 (TACTILE). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a SYND1/CD138 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD328 (SIGLEC7). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a SYND1/CD138 y una molécula de TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CTLA-4. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a SYND1/CD138 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD279 (PD-1). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a SYND1/CD138 y una molécula TRAIL

humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de al menos dos inhibidores de punto de control seleccionados de CD96 (TACTILE), CD328 (SIGLEC7), CTLA-4 y CD279 (PD-1).

5    **CD229**

De manera adecuada, como se describe en el presente documento, se manipulan células NK. De manera adecuada, la célula NK manipulada exhibe un alto nivel de ligando E-selectina. De manera adecuada, la célula NK manipulada que exhibe un alto nivel de ligando de E-selectina exhibe un nivel de unión HECA-452 mayor que el de una célula NK-92. De manera adecuada, la célula NK manipulada comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD229. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD229, además comprende una molécula TRAIL humana variante. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD229, además comprende una molécula TRAIL humana variante, en donde la molécula TRAIL humana variante comprende tres mutaciones de aminoácidos; G131R, N199R y K201H. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD229, además comprende una molécula TRAIL humana variante, en donde la molécula TRAIL humana variante comprende dos mutaciones de aminoácidos; D269H y E195R. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD229 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de una molécula inhibidora de punto de control. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD229 y una molécula de TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD96 (TACTILE). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD229 y una molécula de TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD328 (SIGLEC7). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD229 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CTLA-4. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD229 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD279 (PD-1). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD229 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de al menos dos inhibidores de punto de control seleccionados de CD96 (TACTILE), CD328 (SIGLEC7), CTLA-4 y CD279 (PD-1).

35    **CD47**

De manera adecuada, como se describe en el presente documento, se manipulan células NK. De manera adecuada, la célula NK manipulada exhibe un alto nivel de ligando E-selectina. De manera adecuada, la célula NK manipulada que exhibe un alto nivel de ligando de E-selectina exhibe un nivel de unión HECA-452 mayor que el de una célula NK-92. De manera adecuada, la célula NK manipulada comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD47. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD47, además comprende una molécula TRAIL humana variante. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD47, además comprende una molécula TRAIL humana variante, en donde la molécula TRAIL humana variante comprende tres mutaciones de aminoácidos; G131R, N199R y K201H. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD47, comprende además una molécula TRAIL humana variante, en donde la molécula TRAIL humana variante comprende dos mutaciones de aminoácidos; D269H y E195R. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD47 y una molécula TRAIL humana variante, comprende además la eliminación o reducción en la expresión de una molécula inhibidora de punto de control. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD47 y una molécula de TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD96 (TACTILE). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD47 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD328 (SIGLEC7). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD47 y una molécula de TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CTLA-4. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD47 y una molécula de TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD279 (PD-1). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD47 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de al menos dos inhibidores de punto de control seleccionados de CD96 (TACTILE), CD328 (SIGLEC7), CTLA- 4 y CD279 (PD-1).

60    **CD20**

65    De manera adecuada, como se describe en el presente documento, se manipularon células NK. De manera adecuada, la célula NK manipulada exhibe un alto nivel de unión al ligando de E-selectina. De manera adecuada, la célula NK manipulada que exhibe un alto nivel de ligando de E-selectina exhibe un nivel de unión HECA-452 mayor que el de

una célula NK-92. De manera adecuada, la célula NK manipulada comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD20. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD20, además comprende una molécula TRAIL humana variante.

- 5 De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD20, además comprende una molécula TRAIL humana variante, en donde la molécula TRAIL humana variante comprende tres mutaciones de aminoácidos; G131R, N199R y K201H. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD20, además comprende una molécula TRAIL humana variante, en donde la molécula TRAIL humana variante comprende dos 10 mutaciones de aminoácidos; D269H y E195R. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD20 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de una molécula inhibidora de punto de control. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD20 y una molécula de TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD328 (SIGLEC7). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD20 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o 15 reducción en la expresión de CTLA-4. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD20 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD279 (PD-1). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD20 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de al menos dos 20 inhibidores de punto de control seleccionados de CD96 (TACTILE), CD328 (SIGLEC7), CTLA-4 y CD279 (PD-1).

#### 25 CD19

De manera adecuada, como se describe en el presente documento, se manipulan células NK. De manera adecuada, la célula NK manipulada exhibe un alto nivel de ligando E-selectina. De manera adecuada, la célula NK manipulada que exhibe un alto nivel de ligando de E-selectina exhibe un nivel de unión HECA-452 mayor que el de una célula NK-92.

- 30 De manera adecuada, la célula NK manipulada comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD19. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD19, además comprende una molécula TRAIL humana variante. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD19, además comprende una molécula TRAIL humana variante, en donde la molécula TRAIL humana variante comprende tres mutaciones de aminoácidos; G131R, N199R y K201H. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD19, además comprende una molécula TRAIL humana variante, en donde la molécula TRAIL humana variante comprende dos mutaciones de 35 aminoácidos; D269H y E195R. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD19 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de una molécula inhibidora del punto de control. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD19 y una molécula de TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD96 (TACTILE). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se 40 une específicamente a CD19 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD328 (SIGLEC7). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD19 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CTLA-4. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se 45 une específicamente a CD19 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD279 (PD-1). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD19 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de al menos dos inhibidores 50 de punto de control seleccionados de CD96 (TACTILE), CD328 (SIGLEC7), CTLA-4 y CD279 (PD-1).

#### 55 CD22

De manera adecuada, como se describe en el presente documento, se manipularon células NK. De manera adecuada, la célula NK manipulada exhibe un alto nivel de ligando E-selectina. De manera adecuada, la célula NK manipulada que exhibe un alto nivel de ligando de E-selectina exhibe un nivel de unión HECA-452 mayor que el de una célula NK-92.

- 60 De manera adecuada, la célula NK manipulada comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD22. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD22, además comprende una molécula de TRAIL humana variante. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD22, además comprende una molécula TRAIL humana variante, en donde la molécula TRAIL humana variante comprende tres mutaciones de aminoácidos; G131R, N199R y K201H. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD22, además comprende una molécula TRAIL humana variante, en donde la molécula TRAIL humana variante comprende dos 65

mutaciones de aminoácidos; D269H y E195R. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD22 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de una molécula inhibidora del punto de control. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD22 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD96 (TACTILE). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD22 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD328 (SIGLEC7). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD22 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CTLA-4. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD22 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD279 (PD-1). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD22 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de al menos dos inhibidores de punto de control seleccionados de CD96 (TACTILE), CD328 (SIGLEC7), CTLA-4 y CD279 (PD-1).

### MUC1

De manera adecuada, como se describe en el presente documento, se manipulan células NK. De manera adecuada, la célula NK manipulada exhibe un alto nivel de ligando E-selectina. De manera adecuada, la célula NK manipulada que exhibe un alto nivel de ligando de E-selectina exhibe un nivel de unión HECA-452 mayor que el de una célula NK-92. De manera adecuada, la célula NK manipulada comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a MUC1. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a MUC1, además comprende una molécula de TRAIL humana variante. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a MUC1, además comprende una molécula TRAIL humana variante, en donde la molécula TRAIL humana variante comprende tres mutaciones de aminoácidos; G131R, N199R y K201H. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a MUC1 y una molécula de TRAIL humana variante, además comprende una molécula TRAIL humana variante, en donde la molécula TRAIL humana variante comprende dos mutaciones de aminoácidos; D269H y E195R. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a MUC1 y una molécula de TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de una molécula inhibidora del punto de control. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a MUC1 y una molécula de TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD96 (TACTILE). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a MUC1 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD328 (SIGLEC7). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a MUC1 y una molécula de TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CTLA-4. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a MUC1 y una molécula de TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD279 (PD-1). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a MUC1 y una molécula de TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de al menos dos inhibidores de punto de control seleccionados de CD96 (TACTILE), CD328 (SIGLEC7), CTLA-4 y CD279 (PD-1).

### MUC16

De manera adecuada, como se describe en el presente documento, se manipulan células NK. De manera adecuada, la célula NK manipulada exhibe un alto nivel de ligando E-selectina. De manera adecuada, la célula NK manipulada que exhibe un alto nivel de ligando de E-selectina exhibe un nivel de unión HECA-452 mayor que el de una célula NK-92. De manera adecuada, la célula NK manipulada comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a MUC16. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a MUC16, además comprende una molécula TRAIL humana variante. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a MUC16, además comprende una molécula TRAIL humana variante, en donde la molécula TRAIL humana variante comprende tres mutaciones de aminoácidos; G131R, N199R y K201H. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a MUC16, además comprende una molécula TRAIL humana variante, en donde la molécula TRAIL humana variante comprende dos mutaciones de aminoácidos; D269H y E195R. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a MUC16 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de una molécula inhibidora de punto de control. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a MUC16 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD96 (TACTILE). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a MUC16 y una molécula TRAIL humana variante, además

comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD328 (SIGLEC7). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a MUC16 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CTLA-4. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a MUC16 y una molécula de TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD279 (PD-1). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a MUC16 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de al menos dos inhibidores de punto de control seleccionados de CD96 (TACTILE), CD328 (SIGLEC7), CTLA-4 y CD279 (PD-1).

#### Her2/Neu

De manera adecuada, como se describe en el presente documento, se manipulan células NK. De manera adecuada, la célula NK manipulada exhibe un alto nivel de ligando E-selectina. De manera adecuada, la célula NK manipulada que exhibe un alto nivel de ligando de E-selectina exhibe un nivel de unión HECA-452 mayor que el de una célula NK-92. De manera adecuada, la célula NK manipulada comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a Her2/Neu. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a Her2/Neu, además comprende una molécula TRAIL humana variante. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a Her2/Neu, además comprende una molécula de TRAIL humana variante, en donde la molécula de TRAIL humana variante comprende tres mutaciones de aminoácidos; G131R, N199R y K201H. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a Her2/Neu, además comprende una molécula TRAIL humana variante, en donde la molécula TRAIL humana variante comprende dos mutaciones de aminoácidos; D269H y E195R. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a Her2/Neu y una molécula de TRAIL humana variante, comprende además la eliminación o reducción en la expresión de una molécula inhibidora de punto de control. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a Her2/Neu y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD96 (TACTILE). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a Her2/Neu y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD328 (SIGLEC7). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a Her2/Neu y una molécula de TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CTLA-4. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a Her2/Neu y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD279 (PD-1). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a Her2/Neu y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de al menos dos inhibidores de punto de control seleccionados de CD96 (TACTILE), CD328 (SIGLEC7), CTLA-4 y CD279 (PD-1).

#### Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)

De manera adecuada, como se describe en el presente documento, se manipulan células NK. De manera adecuada, la célula NK manipulada exhibe un alto nivel de ligando E-selectina. De manera adecuada, la célula NK manipulada que exhibe un alto nivel de ligando de E-selectina exhibe un nivel de unión HECA-452 mayor que el de una célula NK-92. De manera adecuada, la célula NK manipulada comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a EGFR. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a EGFR, además comprende una molécula de TRAIL humana variante. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente al EGFR, comprende además una molécula TRAIL humana variante, en donde la molécula TRAIL humana variante comprende tres mutaciones de aminoácidos; G131R, N199R y K201H. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a EGFR, comprende además una molécula TRAIL humana variante, en donde la molécula TRAIL humana variante comprende dos mutaciones de aminoácidos; D269H y E195R. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a EGFR y una molécula de TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de una molécula inhibidora de punto de control. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a EGFR y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD96 (TACTILE). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a EGFR y una molécula de TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD328 (SIGLEC7). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a EGFR y una molécula de TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CTLA-4. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a EGFR y una molécula TRAIL humana variante, comprende además la eliminación o reducción en la expresión de CD279 (PD-1). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a EGFR y una molécula TRAIL humana variante, comprende además la eliminación o reducción en la expresión de CD279 (PD-1).

se une específicamente a EGFR y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de al menos dos inhibidores de punto de control seleccionados de CD96 (TACTILE), CD328 (SIGLEC7), CTLA-4 y CD279 (PD-1).

5

### **Mesotelina**

De manera adecuada, como se describe en el presente documento, se manipulan células NK. De manera adecuada, la célula NK manipulada exhibe un alto nivel de ligando E-selectina. De manera adecuada, la célula NK manipulada que exhibe un alto nivel de ligando de E-selectina exhibe un nivel de unión HECA-452 mayor que el de una célula NK-92. De manera adecuada, la célula NK manipulada comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a la mesotelina. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a la mesotelina, además comprende una molécula TRAIL humana variante. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a Mesotelina, además comprende una molécula TRAIL humana variante, en donde la molécula TRAIL humana variante comprende tres mutaciones de aminoácidos; G131R, N199R y K201H. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a la mesotelina, comprende además una molécula TRAIL humana variante, en donde la molécula TRAIL humana variante comprende dos mutaciones de aminoácidos; D269H y E195R. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a la mesotelina y una molécula de TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de una molécula inhibidora del punto de control. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a mesotelina y una molécula de TRAIL humana variante, comprende además la eliminación o reducción en la expresión de CD96 (TACTILE). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a Mesotelina y una molécula de TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD328 (SIGLEC7). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a mesotelina y una molécula de TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CTLA-4. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a la mesotelina y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD279 (PD-1). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a la mesotelina y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de al menos dos inhibidores de punto de control seleccionados de CD96 (TACTILE), CD328 (SIGLEC7), CTLA-4 y CD279 (PD-1).

35

### **CLL-1**

De manera adecuada, como se describe en el presente documento, se manipulan células NK. De manera adecuada, la célula NK manipulada exhibe un alto nivel de ligando E-selectina. De manera adecuada, la célula NK manipulada que exhibe un alto nivel de ligando de E-selectina exhibe un nivel de unión HECA-452 mayor que el de una célula NK-92. De manera adecuada, la célula NK manipulada comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CLL-1. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CLL-1, además comprende una molécula TRAIL humana variante. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CLL-1, además comprende una molécula TRAIL humana variante, en donde la molécula TRAIL humana variante comprende tres mutaciones de aminoácidos; G131R, N199R y K201H. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CLL-1, además comprende una molécula TRAIL humana variante, en donde la molécula TRAIL humana variante comprende dos mutaciones de aminoácidos; D269H y E195R. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CLL-1 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de una molécula inhibidora del punto de control. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CLL-1 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD96 (TACTILE). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CLL-1 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD328 (SIGLEC7). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CLL-1 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CTLA-4. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CLL-1 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD279 (PD-1). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CLL-1 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de al menos dos inhibidores de punto de control seleccionados de CD96 (TACTILE), CD328 (SIGLEC7), CTLA-4 y CD279 (PD-1).

65

**CD38**

De manera adecuada, como se describe en el presente documento, se manipulan células NK. De manera adecuada, la célula NK manipulada exhibe un alto nivel de ligando E-selectina. De manera adecuada, la célula NK manipulada que exhibe un alto nivel de ligando de E-selectina exhibe un nivel de unión HECA-452 mayor que el de una célula NK-92. De manera adecuada, la célula NK manipulada comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD38. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD38, además comprende una molécula TRAIL humana variante. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD38, además comprende una molécula TRAIL humana variante, en donde la molécula TRAIL humana variante comprende tres mutaciones de aminoácidos; G131R, N199R y K201H. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD38, además comprende una molécula TRAIL humana variante, en donde la molécula TRAIL humana variante comprende dos mutaciones de aminoácidos; D269H y E195R. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD38 y una molécula TRAIL humana variante, comprende además la eliminación o reducción en la expresión de una molécula inhibidora del punto de control. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD38 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD96 (TACTILE). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD38 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD328 (SIGLEC7). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD38 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CTLA-4. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD38 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD279 (PD-1). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD38 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de al menos dos inhibidores de punto de control seleccionados de CD96 (TACTILE), CD328 (SIGLEC7), CTLA-4 y CD279 (PD-1).

**CD38 (SEQ ID NO: 1 y 2)**

De manera adecuada, como se describe en el presente documento, se manipulan células NK. De manera adecuada, la célula NK manipulada exhibe un alto nivel de ligando E-selectina. De manera adecuada, la célula NK manipulada que exhibe un alto nivel de ligando de E-selectina exhibe un nivel de unión HECA-452 mayor que el de una célula NK-92. De manera adecuada, la célula NK manipulada comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD38. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD38 comprende un dominio de direccionamiento CAR que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 1, y una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntico al establecido en SEQ ID NO: 2. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD38 comprende un dominio de direccionamiento CAR que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 1, y una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 2. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD38 comprende un dominio de direccionamiento CAR que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 98% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 1, y una secuencia de aminoácidos al menos 98% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 2. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD38 comprende un dominio de direccionamiento CAR que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 1, y una secuencia de aminoácidos idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 2. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD38, además comprende una molécula TRAIL humana variante. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD38, además comprende una molécula TRAIL humana variante, en donde la molécula TRAIL humana variante comprende tres mutaciones de aminoácidos; G131R, N199R y K201H. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD38, además comprende una molécula TRAIL humana variante, en donde la molécula TRAIL humana variante comprende dos mutaciones de aminoácidos; D269H y E195R. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD38 y una molécula TRAIL humana variante, comprende además la eliminación o reducción en la expresión de una molécula inhibidora del punto de control. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD38 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD96 (TACTILE). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD38 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD328 (SIGLEC7). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD38 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CTLA-4. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD38 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CTLA-4.

5 quimérico que se une específicamente a CD38 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD279 (PD-1). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD38 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de al menos dos inhibidores de punto de control seleccionados de CD96 (TACTILE), CD328 (SIGLEC7), CTLA-4 y CD279 (PD-1).

#### **CD38 (SEQ ID NO: 3 y 4)**

- 10 De manera adecuada, descrito aquí, son células NK manipuladas. De manera adecuada, la célula NK manipulada exhibe un alto nivel de ligando E-selectina. De manera adecuada, la célula NK manipulada que exhibe un alto nivel de ligando de E-selectina exhibe un nivel de unión HECA-452 mayor que el de una célula NK-92. De manera adecuada, la célula NK manipulada comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD38. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD38 comprende un dominio de direccionamiento CAR que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a la establecida en la SEQ ID NO: 3, y una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntico al establecido en SEQ ID NO: 4. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD38 comprende un dominio de direccionamiento CAR que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 3, y una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 4. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD38 comprende un dominio de direccionamiento CAR que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 98% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 3, y una secuencia de aminoácidos al menos 98% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 4. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD38 comprende un dominio de direccionamiento CAR que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 3, y una secuencia de aminoácidos idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 4. De manera adecuada, la célula NK modificada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD38 comprende un dominio de direccionamiento CAR que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 3, y una secuencia de aminoácidos idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 4. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno químérico que se une específicamente a CD38, además comprende una molécula TRAIL humana variante. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno químérico que se une específicamente a CD38, además comprende una molécula TRAIL humana variante, en donde la molécula TRAIL humana variante comprende tres mutaciones de aminoácidos; G131R, N199R y K201H. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno químérico que se une específicamente a CD38, además comprende una molécula TRAIL humana variante, en donde la molécula TRAIL humana variante comprende dos mutaciones de aminoácidos; D269H y E195R. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno químérico que se une específicamente a CD38 y una molécula TRAIL humana variante, comprende además la eliminación o reducción en la expresión de una molécula inhibidora del punto de control. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno químérico que se une específicamente a CD38 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD96 (TACTILE). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno químérico que se une específicamente a CD38 y una molécula de TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD328 (SIGLEC7). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno químérico que se une específicamente a CD38 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CTLA-4. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno químérico que se une específicamente a CD38 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD279 (PD-1). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno químérico que se une específicamente a CD38 comprende un dominio de direccionamiento CAR que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a la establecida en la SEQ ID NO: 5 y una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntico al establecido en SEQ ID NO: 6. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno químérico que se une específicamente a CD38 comprende un dominio de direccionamiento CAR que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 5, y una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 6. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno químérico que se une específicamente a CD38 comprende un dominio de direccionamiento CAR que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 98% idéntica a la

#### **CD38 (SEQ ID NO: 5 y 6)**

- 55 De manera adecuada, como se describe en el presente documento, se manipulan células NK. De manera adecuada, la célula NK manipulada exhibe un alto nivel de ligando E-selectina. De manera adecuada, la célula NK manipulada que exhibe un alto nivel de ligando de E-selectina exhibe un nivel de unión HECA-452 mayor que el de una célula NK-92. De manera adecuada, la célula NK manipulada comprende un receptor de antígeno químérico que se une específicamente a CD38. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno químérico que se une específicamente a CD38 comprende un dominio de direccionamiento CAR que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a la establecida en la SEQ ID NO: 5 y una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntico al establecido en SEQ ID NO: 6. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno químérico que se une específicamente a CD38 comprende un dominio de direccionamiento CAR que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 5, y una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 6. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno químérico que se une específicamente a CD38 comprende un dominio de direccionamiento CAR que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 98% idéntica a la

establecida en SEQ ID NO: 5, y una secuencia de aminoácidos al menos 98% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 6. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende Un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD38 comprende un dominio de direccionamiento CAR que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 5, y una secuencia de aminoácidos idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 6. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD38 comprende un dominio de direccionamiento CAR que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 5, y una secuencia de aminoácidos idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 6. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD38, además comprende una molécula TRAIL humana variante. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD38, además comprende una molécula TRAIL humana variante, en donde la molécula TRAIL humana variante comprende tres mutaciones de aminoácidos; G131R, N199R y K201H. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD38, además comprende una molécula TRAIL humana variante, en donde la molécula TRAIL humana variante comprende dos mutaciones de aminoácidos; D269H y E195R. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD38 y una molécula TRAIL humana variante, comprende además la eliminación o reducción en la expresión de una molécula inhibidora del punto de control. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD38 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD96 (TACTILE). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD38 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD328 (SIGLEC7). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD38 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CTLA-4. De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD38 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de CD279 (PD-1). De manera adecuada, la célula NK manipulada que comprende un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a CD38 y una molécula TRAIL humana variante, además comprende la eliminación o reducción en la expresión de al menos dos inhibidores de punto de control seleccionados de CD96 (TACTILE), CD328 (SIGLEC7), CTLA-4 y CD279 (PD-1).

## EJEMPLOS

La invención se ilustra ahora en ejemplos con referencia a las figuras adjuntas.

### **Ejemplo 1 - La línea celular NK KHYG-1 exhibe un nivel más alto de ligandos de E-selectina que la línea celular NK-92**

Para determinar la expresión de ligandos de E-selectina en diferentes líneas celulares NK se cultivaron células NK-92 y KHYG-1 en medio RPMI 1640 suplementado con FBS al 10% e IL-2 a 10 ng/ml. Las células se tomaron del cultivo, se lavaron y se tiñeron con anticuerpo HECA-452 conjugado con PE o control de isótipo PE. Las células se corrieron luego en un citómetro de flujo y se determinó la intensidad de fluorescencia media (MFI) para cada línea celular en comparación con el control. La Figura 2A es un experimento representativo y muestra que las células KHYG-1 exhiben una reactividad 202 de HECA-452 mucho mayor en comparación con el control de isótipo 201 (MFI de 2772 frente a 221). La Figura 2B muestra el resultado opuesto con células NK-92 que exhiben una baja reactividad HECA-452 204 en comparación con el control de isótipo 203 (MFI de 545 frente a 121).

### **Ejemplo 2 - La línea celular NK KHYG-1 exhibe un fenotipo in vitro de ligando de E-selectina reducido**

Para determinar si esto aumentó la reactividad de HECA-452 traducida en una diferencia fenotípica en la migración de células KHYG-1 y NK-92, se examinaron in vitro. Primero, se examinó la migración a lo largo de un gradiente de factor 1 derivado del estroma (SDF-1). La figura 3 muestra que las células KHYG-1 (barra izquierda) exhibieron aproximadamente un aumento de 6 veces en la migración en comparación con las células NK-92 (barra derecha). Además, se controló la migración en una célula de flujo revestida con E-selectina. Las Figuras 4A y B muestran imágenes fijas de video tomadas durante el ensayo de la célula de flujo. La Figura 4A muestra que muchas células KHYG-1 están inmóviles o exhiben un movimiento muy lento en el ensayo de células de flujo (asteriscos). Por el contrario, la Figura 4B muestra que el flujo de NK-92 sin obstáculos a través del marco de la célula de flujo.

### Ensayo de migración

Las células de la fase logarítmica NK-92 o KHYG1 se cosecharon, lavaron y suspendieron en medio de cultivo sin suero (RPMI1640 para KHYG1, aMEM para NK-92) que contenía 10 ng/ml de IL-2 para ser privadas de alimento durante 4 horas. Se añadieron 600 µl de medio de cultivo sin suero que contenía 100 ng/ml de SDF1 y 10 ng/ml de IL-2 a cada pozo (para placa de 12 pozos), luego se cargaron 100 µl de suspensión de células privadas de alimento en las cámaras de migración superiores de ese tamaño de poro es 5.0 µm (Costar; Corning). Las células se cultivaron luego durante 4 horas a 37°C en una incubadora de CO<sub>2</sub>. Despues de 4 horas, se cosechó el medio en el

compartimento inferior (que contenía células migradas) y se contó el número de células usando un citómetro de flujo BD Accuri™ C6.

5 Célula de flujo/ensayo de rodamiento

El ensayo de rodamiento se realizó en biochips para microfluidos de 8 canales (Cellix Limited, Dublín, Irlanda) usando un Mirus Evo NanoPump (Cellix Limited). Los canales del biochip Vena8 Fluoro+ (Cellix Limited) se revistieron con 15 µg/ml de E-selectina (PeProtech, Rocky Hill, Estados Unidos) En Tris-HCl pH 7.4 suplementado con CaCl<sub>2</sub> 1 mM y se 10 incubaron durante la noche a 4°C. Cada canal se bloqueó con BSA al 1% (albúmina de suero bovino) o cuando se indicó con 15 µg/ml de anticuerpo bloqueador anti-E-selectina (Clon BBIG-E1, Sistema de I+D; Minneapolis, Estados Unidos) y se incubó a 37°C durante 1 h antes del ensayo. Las células se lavaron y se volvieron a suspender en 15 regulador de ensayo de rodamiento (medio RPMI 1640 sin rojo fenol suplementado con 1% de FBS inactivado por calor (suero bovino fetal), HEPES 5 mM y CaCl<sub>2</sub> 1 mM) a 2x10<sup>6</sup> células/ml. Se cargaron 80 µL de suspensión celular 20 en los microcanales y se realizó un ensayo de rodamiento a 0.5 dinas/cm<sup>2</sup> a temperatura ambiente. Las células se monitorizaron en 5 posiciones diferentes a lo largo del canal utilizando un lente objetivo A-Plan 10X/0.25 (Carl Zeiss Microscopy GmbH; Jena, Alemania) de un microscopio AX10Vert.A1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH). Se recogieron 30 retículos por posición a 0.5 segundos entre sí utilizando una cámara QIClick F-M-12 Mono de 12 bits (QImaging; Surrey, Canadá). Las imágenes se adquirieron utilizando el software de ensayo Vena Flux (Cellix Limited) y se analizaron utilizando el software Image-Pro Premiere (Media Cybernetics; Rockville, Estados Unidos). Una célula se definió como una célula que se desplaza una distancia correspondiente a más de su diámetro. Se contó el número total de células de 5 posiciones diferentes por canal, luego se calculó el número promedio de todos los canales.

25 **Ejemplo 3 - Retorno in vivo de la línea celular NK KHYG-1**

En un modelo de ratón in vivo, se realizará un seguimiento de la localización de las células NK a nichos distantes de la médula ósea. Esto se realizará mediante el uso de microscopía confocal in vivo o análisis por citometría de flujo en 30 la médula ósea. Las líneas celulares que se analizarán para determinar el retorno en la médula ósea serán KHYG-1 (alta unión a HECA-452) y el NK-92 alto (baja unión a HECA-452). Ambas líneas celulares se inyectarán en el mismo ratón, pero se marcarán con dos fluoróforos diferentes para realizar un análisis competitivo de retorno en la médula ósea. Se observaría un punto de tiempo, tal como 4, 8, 12 o 24 horas.

Las células NK se marcarán con colorantes fluorescentes (Calceína AM o CellTracker Dyes). Luego, se tomará una 35 imagen in vivo del BM con un sistema confocal Zeiss 710 (Carl Zeiss Microimaging, Jena, Alemania) o se cuantificará con un citómetro de flujo FACS Aria II. En el confocal, se realizará un colgajo de piel en el cuero cabelludo de los ratones para exponer la superficie del cráneo dorsal subyacente. Las imágenes de los tumores se capturarán en sesiones de aproximadamente 1 hora de duración utilizando microscopía confocal in vivo. Las imágenes con detalles 40 celulares se obtendrán a través del cráneo del ratón intacto a profundidades de hasta 250 µm desde la superficie del cráneo utilizando un objetivo 10x 0.45NA Plan-Apo (Carl Zeiss Microimaging). Se adquirirán múltiples profundidades de imagen y se realizará una proyección z de máxima intensidad en la imagen J para fusionar las imágenes. GFP se excitará con la línea de 488 nm en un láser de argón. Se tomarán imágenes de los vasos sanguíneos usando Evans Blue (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) excitado con un láser de 633 nm. Las señales de emisión serán recogidas por los detectores confocales internos Quasar de Zeiss.

45 **Ejemplo 4 - Eficacia in vivo de las células NK que expresan CD38 CAR contra el mieloma múltiple**

Transducir células KHYG-1 con CAR CD38 de alta, intermedia y baja afinidad

Los constructos CD38 CAR de segunda generación se generan con dominios de direccionamiento de diferentes 50 afinidades: alta, intermedia y baja. El CAR también comprende un dominio coestimulador CD3ζ y 4-1BB y está unido por una secuencia 2A a ΔNGFR (el gen marcador que se usará para rastrear células transducidas por CAR) separado como un marcador de transducción. Las diferentes CD38 CAR de afinidad se generarán como construcciones lenti- o retrovirales, ya que no se sabe bien qué tipo de construcciones transducirán mejor las células KHYG-1. Se utilizarán 55 secuencias para el dominio de direccionamiento CAR derivado de SEQ ID NOs: 1-6. Dependiendo de los resultados de los experimentos piloto en los que se abordará este problema, se transducirán las células KHYG-1 con las diferentes construcciones CD38 CAR y se seleccionarán para una alta pureza para probar su eficacia funcional contra las líneas celulares de mieloma múltiple (MM) como se describe más abajo.

En la etapa de prueba funcional, se controlarán las células KHYG-1 transducidas por CAR para la proliferación y 60 expansión (recuento celular), CD16, CD56, CD3, KIR2DL1, KIR2DL2/3, KIR3DL1 y NKG2A en el día 0 semana 1, 3 y 6 (al final de la expansión) También se investigará la expresión del marcador de apoptosis anexina-V. Otro parámetro fenotípico importante es la expresión de CD38, ya que se ha observado que las células T CAR no expresan CD38, a pesar de su estado activado. Posteriormente se evaluará su capacidad de secreción proliferativa y de citoquinas dependientes de CD38 (IFNγ y TNFα) contra las células CD38+ MM (ensayos CFSE). Los ensayos de citotoxicidad 65 basados en BLI se utilizarán para medir la actividad citotóxica de las células CD38 CAR NK hacia diversas líneas celulares MM transducidas con luciferasa. También se usará la línea celular K562 susceptible a células NK como una célula objetivo.

La desgranulación dependiente de CD38 de las células NK tras la estimulación con UM9 (CD38 alto) frente a U266 (CD38 negativo) se analizará analizando la regulación ascendente de CD107a en la superficie de las células CAR NK positivas para ΔNGFR usando citometría de flujo. La reactividad citotóxica contra las células MM primarias se evaluará en ensayos de citotoxicidad basados en FACS utilizando los BMMNC derivados de pacientes, como se describió anteriormente. Brevemente, las células CD38 CAR NK se cultivarán conjuntamente con los BMMNC que contienen células MM al 5-50% en diferentes relaciones efector a objetivo. 24 a 48 horas después, la supervivencia de las células MM se evaluará mediante la enumeración de las células plasmáticas positivas para CD138 utilizando citometría de flujo cuantitativa. La actividad citotóxica se deducirá de estos datos de supervivencia como se describió anteriormente.

En esta fase de la investigación también es importante determinar la reactividad frente a células hematopoyéticas positivas para CD38 no malignas. Esto se evaluará mediante ensayos de citotoxicidad basados en FACS utilizando PBMC o BMMNC de individuos o pacientes sanos. Después de la incubación conjunta de las células CD38 CAR NK con PBMC o BMMNC durante 24 a 48 horas, la supervivencia de las células hematopoyéticas no malignas, incluidas las células progenitoras hematopoyéticas CD34+ (solo en muestras de BMMNC), células T CD3+, monocitos CD14+, células CD56+ NK, Las células B CD19/20+ se determinarán en análisis FACS cuantitativos de plataforma única. En todos estos ensayos, las células NK transducidas de vector simulado se usarán como control negativo, las células CART CD38 establecidas anteriormente se usarán como controles positivos.

Transducir la célula CD38 CAR NK-92 más óptima con la variante TRAIL (TRAILv) y TRAIL tipo salvaje (TRAILwt).

Transducir la célula CD38 CAR KHYG-1 más óptima con TRAILv y TRAIL wt.

Las células CD38 CAR NK que son las mejores para matar células MM sin afectar a las células CD38+ normales se seleccionarán y se transducirán adicionalmente con los constructos variantes TRAIL y TRAIL de tipo salvaje. En un entorno similar descrito anteriormente, estas células se probarán frente a las líneas celulares DR5+CD38+, DR5+CD38-, DR5-CD38+, DR5-, CD38- MM para comparar sus actividades citotóxicas dependientes de CD38 y DR-5 y comparar su célula objetivo especificidad. Las células MM primarias también se estudiarán para determinar su susceptibilidad contra estas células. Para generar la construcción TRAILv inducible, se clonará el gen TRAILv en una construcción lentiviral auto inactivadora pseudotipificada VSV-g incompetente de replicación bajo el control de un promotor CMV mínimo (m) y repeticiones en tandem del elemento de respuesta transcripcional NFAT (TRE). De esta manera, habilitaremos la inducción rápida de TRAILv tras la activación de CAR, que induce la expresión génica bajo el control de NFAT. En consecuencia, tras la activación de CAR, el dominio CD3 zeta activa NFAT que luego inducirá una transcripción rápida y la posterior expresión de TRAILv. Las células generadas se evaluarán primero para la expresión de TRAILv dependiente de CD38 CAR. Después de estudiar la cinética de activación/desactivación de este gen inducible, las células serán, en un entorno similar descrito anteriormente, estudiadas para determinar la capacidad de matar las líneas celulares DR5+CD38+, DR5+CD38-, DR5-CD38+, DR5-, CD38- MM y células MM primarias.

Evaluar los mejores CD38 CAR in vivo eficacia anti-MM y MM vs capacidad discriminadora de células hematopoyéticas normales

En esta etapa se determinará la seguridad in vivo y la eficacia anti-MM de las mejores células CD38 CAR NK que funcionan in vitro. La actividad in vivo de las células NK transducidas con el mejor CD38 CAR (y TRAILv) se evaluará en el presente modelo de xenoinjerto Rag2-/yc-/ desarrollado recientemente en donde los tumores MM humanos crecen en un microambiente humanizado que se genera a través de la inoculación subcutánea de andamios recubiertos con MSC derivadas de médula ósea humana. En resumen, en este modelo, los tumores U38-UM-9 positivos para CD38 y U266 MM negativos para CD38 se establecerán en un microambiente de BM humanizado. Después de demostrar el injerto de tumores MM en los andamios humanizados por BLI (generalmente 1-2 semanas después de la inoculación), los ratones serán tratados con células iCasp9-CD38 CAR NK. Las células serán inyectadas i.v. o intraandamio a dosis crecientes (una dosis total de 3, 6 y  $30 \times 10^6$  células/ratón i.v.; 1.5, 3, y  $9 \times 10^6$  células intraandamio). La dosis total de células CAR NK se dividirá en tres y cada dosis se administrará con intervalos de una semana. La carga tumoral será monitoreada por BLI. Las células NK transducidas simuladas y las células CART CD38 se utilizarán como controles negativos y positivos, respectivamente.

**55 Ejemplo 5 - Protocolo para la terapia de mieloma múltiple por receptores de células CD38 CAR NK**

Como se indicó anteriormente, las células CD38 CAR NK pueden administrarse a individuos con diferentes tipos de cáncer. El siguiente protocolo fue desarrollado para uso en el tratamiento de pacientes con mieloma múltiple. Después del diagnóstico de un paciente con un cáncer CD38 positivo, como el mieloma múltiple, se puede descongelar y cultivar una alícuota de células NK modificadas antes de la administración al paciente. Alternativamente, se puede preparar una transfección transitoria usando lentivirus que lleva un polinucleótido que codifica un CD38 CAR, o electroporación con ARNm que codifica un CAR, como se describe en el presente documento. Para la electroporación, la plataforma MaxCyte Flow Electroporation ofrece una solución adecuada para lograr transfecciones rápidas a gran escala en la clínica. Después de que se transfecta una célula NK que expresa el CD38 CAR, se cultiva para permitir la expresión del CAR y luego se administra i.v. al paciente.

**Ejemplo 6 - Eficacia in vitro de la variante TRAIL que expresa células NK contra el mieloma múltiple y la leucemia mieloígena aguda**

- 5 El mieloma múltiple (MM), la leucemia mieloide aguda (LMA) y el carcinoma de células renales (CCR) son tumores malignos debilitantes y con frecuencia fatales. CCR, MM y LMA son susceptibles a la citotoxicidad de las células NK a través de múltiples vías efectoras, incluida la TRAIL de células NK. El tratamiento de células malignas con bortezomib aumenta la expresión de DR5 en muchos tumores malignos y aumenta su susceptibilidad a la apoptosis mediada por TRAIL. Es importante destacar que las células NK se expandieron ex vivo usando EBV-LCL que aumentan sustancialmente la expresión superficial de TRAIL, aumentando aún más la muerte tumoral mediada por células NK de tumores expuestos a bortezomib. Por lo tanto, la modificación genética de las células NK para expresar la variante TRAIL específica de DR5 mutada de longitud completa podría mejorar la citotoxicidad específica del tumor de las células NK independientemente de la citotoxicidad mediada por gránulos. Además, se pronostica que los tumores expuestos a bortezomib que regulan al alza DR5 se volverán exquisitamente sensibles a la muerte por estas células NK genéticamente modificadas.

Plan experimental in vitro

- 20 Las células NK expandidas ex vivo (células NK expandidas usando condiciones GMP y la línea celular de alimentación SMI-LCL) genéticamente modificadas para expresar TRAIL recombinante específico de DR-5 (rhTRAIL D269H/E195R) se examinarán para ver si pueden potenciar NK muerte celular mediadora contra objetivos tumorales CCR, LMA y MM in vitro, y además, si la destrucción tumoral se puede mejorar pretratando los objetivos tumorales con bortezomib. Los experimentos de citotoxicidad tumoral se realizarán in vitro, utilizando un ensayo de liberación de cromo (CRA) y ensayos de desgranulación de células NK (CD107a), con células NK expandidas ex vivo contra un panel de líneas celulares tumorales que se sabe que expresan DR-5, que puede regularse al alza con tratamiento con bortezomib. Para identificar si la destrucción del tumor de células NK se efectúa de manera diferente entre las poblaciones de células NK, se realizarán ensayos de citotoxicidad tumoral utilizando diferentes preparaciones de células NK. Las poblaciones incluyen: a) células NK recién aisladas; b) células NK activadas con IL-2 durante la noche; c) células NK expandidas ex vivo de 14 días usando células alimentadoras EBV-LCL; d) ARNm de células NK expandidas ex vivo de 14 días sometidas a electroporación usando el sistema Maxcyte GT para expresar TRAIL recombinante específico de DR-5; y e) células NK expandidas ex vivo de 14 días transducidas usando un vector lentiviral (LV) para expresar TRAIL recombinante específico de DR-5.

- 35 Se probarán diversas MOI de transducción para optimizar la expresión de la superficie de TRAIL. Los objetivos serán: a) definir la cinética de la expresión de la superficie TRAIL durante un período de 4 semanas después de la transducción de células NK (in vitro); b) definir la cinética de la muerte del tumor de células NK a través de TRAIL durante varios períodos después de la transducción de células NK; c) valorar los efectos de la transducción de TRAIL específica de DR-5 sobre el fenotipo, el potencial de secreción de citoquinas y la citotoxicidad funcional de las células NK; evaluar los efectos de la transducción de TRAIL específica de DR-5 sobre la proliferación de células NK in vitro; y d) evaluar los efectos de la transducción de TRAIL específica de DR-5 sobre la viabilidad de las células NK.

- 40 Se analizarán diversas concentraciones de ARNm que codifica el TRAIL recombinante específico de DR-5 para optimizar la transfección de células NK para expresar TRAIL recombinante (in vitro). Los objetivos serán: a) definir la cinética de la expresión de TRAIL recombinante durante 4-7 días después de la transfección de ARNm; b) comparar estas cinéticas de expresión de TRAIL con células NK transfectadas con ARNm que codifica la superficie expresada CD34 como control; c) definir la cinética de la muerte del tumor de células NK a través de TRAIL después de la transfección de células NK con TRAIL recombinante DR-5 durante un período de una semana; d) evaluar los efectos de la transfección de ARNm de TRAIL específica de DR-5 sobre el fenotipo, el potencial de secreción de citoquinas y la citotoxicidad funcional de las células NK; e) evaluar los efectos de la transfección de ARNm de TRAIL específica de DR-5 sobre la proliferación de células NK in vitro; f) y evaluar los efectos de la transfección de ARNm de TRAIL específica de DR-5 sobre la viabilidad de las células NK. También nos dirigiremos a las células NK (genéticamente manipuladas frente a las de tipo salvaje) contra el tumor tumoral CCR, MM y AML +/- pretratados con bortezomib para aumentar la expresión de la superficie tumoral del receptor DR5.

55 Plan experimental in vivo

- 60 A continuación, se examinarán células NK expandidas ex-vivo genéticamente modificadas para expresar TRAIL recombinante específico de DR-5 para ver si pueden potenciar la muerte de células NK contra objetivos tumorales CCR, LMA y MM in vivo. Las células NK expandidas ex vivo genéticamente modificadas para expresar el TRAIL recombinante específico de DR-5 se infundirán de manera adoptiva en ratones portadores de tumor de MM IS (NSG) para comparar los resultados de ratones no tratados y tratados usando imágenes de bioluminiscencia (BLI). Las condiciones incluirán células NK frescas, activadas por IL-2 y expandidas, así como células NK expandidas genéticamente modificadas para expresar TRAIL recombinante específico de DR-5 mediante transducción viral y transfección de ARNm. La misma metodología se evaluará en el CCR con SAUJ-Luc y en AML en ratones con tumor MOLM14-Luc. Las dianas tumorales transducidos con luciferasa nos permitirán utilizar imágenes BLI para evaluar la carga tumoral en estos modelos.

Se investigará si el momento del tratamiento afecta los resultados. Las células NK se infundirán inmediatamente después de la transfección de ARNm frente a retrasar la infusión de células NK después de la transfección de ARNm hasta el momento en que la expresión superficial de TRAIL alcanza su punto máximo. También se investigará el impacto de la administración exógena de IL-2 y/o IL-15 sobre la muerte de tumores de células NK *in vivo*. Se investigará el impacto del pretratamiento de animales con bortezomib en la destrucción de tumores por células NK genéticamente modificadas para expresar TRAIL específico de DR-5 recombinante. También se evaluarán los experimentos *in vivo* anteriores en MM y AML con células NK expandidas *ex vivo* manipuladas para expresar DR-5 utilizando una población de células NK expandida que ha sufrido; a) modificación genética; b) una modificación de cultivo; o c) manipulación *ex vivo* para mejorar el recorrido hacia la médula ósea.

**Ejemplo 7 - Anulación de la función inhibidora del receptor**

CRISPR/Cas9

Se prepararon como sigue células que tienen anulada la función inhibidora del receptor. Los constructos de ARNg se diseñaron y prepararon para dirigirse a los genes que codifican el receptor inhibidor "clásico" LIR2 y el receptor inhibidor "punto de control" CTLA4 en el genoma humano de las células NK. La edición del genoma CRISPR/Cas9 se utilizó para eliminar los genes diana LIR2 y CTLA4.

Se seleccionaron dos candidatos de ARNg para cada gen diana y se determinaron sus eficacias de escisión en células K562. Las secuencias de los candidatos de ARNg se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Candidatos y secuencias de ARNg		
Gen	Nombre del plásmido	Secuencia
hLIR2	SM682.LIR2.g9	GAGTCACAGGTGGCATTGGCGG (SEQ ID NO: 24)
	SM682.LIR2.g18	CGAACATCGCAGGTGGTCGCACAGG (SEQ ID NO: 25)
hCTLA4	SM683.CTLA4.g7	CACTCACCTTGAGAACAGG (SEQ ID NO: 26)
	SM683.CTLA4.g15	CCTTGCGCTGAAATCCAAGG (SEQ ID NO: 27)

Se transfecaron células K562 con los constructos de ARNg preparados (Figura 5) y posteriormente se cosecharon para la amplificación por PCR. La presencia de expresión de GFP se usó para informar la incorporación exitosa de la construcción de ARNg en las células K562. Esto confirmó la expresión del gen Cas9 y, por lo tanto, la capacidad de eliminar la expresión de los genes LIR2 y CTLA4. La actividad de escisión de los constructos de ARNg se determinó usando un ensayo de detección de emparejamiento erróneo *in vitro*. La endonucleasa I de T7E1 reconoce y escinde ADN que no coincide perfectamente, permitiendo que los genes parentales LIR2 y CTLA4 sean comparados con los genes mutados después de la transfección CRISPR/Cas9 y la unión de extremos no homólogos (NHEJ).

La Figura 6 muestra las bandas resultantes después de la electroforesis en gel de agarosa después de la eliminación del gen LIR2 con las secuencias de ARNg g9 y g18. Las tres bandas correspondientes a cada mutación se relacionan con el gen parental (601) y las dos cadenas resultantes después de la detección de un desajuste en la secuencia de ADN después de la transfección (602 y 603). La secuencia de ARNg g9 dio como resultado una tasa de transfección de éxito del 11%, mientras que el ARNg g18 dio como resultado el 10%.

La Figura 7 muestra las bandas resultantes después de la electroforesis en gel de agarosa después de la eliminación del gen CTLA4 con las secuencias de ARNg g7 y g15. 701 muestra las bandas parentales y 702; 703 muestran las dos bandas resultantes después de la detección de desajuste. La secuencia de ARNg g7 dio como resultado una tasa de transfección de 32% de éxito, mientras que el ARNg g15 dio como resultado un 26%.

Tras la eliminación exitosa de LIR2 y CTLA4 en células K562, las células KHYG-1 se transfecaron con construcciones de ARNg. Se seleccionaron los clones derivados de KHYG-1 que tienen eliminaciones homocigóticas. Se usó un vector de expresión Cas9/puromicina acetiltransferasa (PAC) para este propósito. Se seleccionaron con éxito las células transfecadas, en función de su resistencia al antibiótico puromicina.

Cas9 RNP

Otro protocolo utilizado para la desactivación de los receptores inhibidores del punto de control en las células NK fue el de la transfección de Cas9 RNP. Una ventaja de usar este protocolo fue que se lograron eficiencias de transfección similares, pero con una toxicidad significativamente menor en comparación con el uso de los plásmidos de ADN del protocolo CRISPR/Cas9. Se recogieron  $1 \times 10^6$  células KHYG1 para cada experimento de transfección. Las células se lavaron con PBS y se centrifugaron en una centrífuga. El sobrenadante fue descartado. Los materiales CRISPR RNP (proteína de unión a ARN) se prepararon de la siguiente manera: (1) se preparó una solución 20  $\mu$ M del ARNcr y ARNt sintetizados requeridos (adquiridos de Dharmacon); (2) 4  $\mu$ l de ARNcr (20  $\mu$ M) y 4  $\mu$ l de ARNt (20  $\mu$ M) se mezclaron entre sí; (3) la mezcla se añadió luego a 2  $\mu$ l de proteína Cas9 (5  $\mu$ g/ $\mu$ l); (4) todos los componentes se mezclaron y se

incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Siguiendo el Sistema de transfección Neon®, las células se mezclaron con Cas9 RNP y la electroporación se realizó usando los siguientes parámetros: Voltaje: 1450v; ancho de pulso, 30 ms; número de pulso: 1. Las células se transfirieron luego a un pozo de una placa de 12 pozos que contenía medio de crecimiento (incluyendo IL-2 e IL-15). Las células se cosecharon después de 48-72 horas para confirmar la eficacia de la edición de genes mediante el ensayo de endonucleasa T7 y/o la secuenciación de Sanger. Se confirmó la presencia de indeles, lo que indica la eliminación exitosa de CTLA4, PD1 y CD96 en células KHYG1.

#### Nucleasas específicas del sitio

Otro protocolo utilizado para la desactivación de los receptores inhibidores del punto de control en las células NK fue el de la transfección con XTN TALEN. Una ventaja de usar este protocolo fue que se podía lograr un nivel de especificidad particularmente alto en comparación con CRISPR de tipo salvaje.

#### 15 *Paso 1: Preparación de reactivos*

Las células KHYG-1 se analizaron para ciertos atributos que incluyen la eficiencia de transfección, la eficiencia de clonación de células individuales y el número de cariotipo/copia. Las células se cultivaron de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. Dependiendo del receptor inhibidor del punto de control que se eliminó, las nucleasas se prepararon por diseño personalizado de al menos 2 pares de XTN TALEN. El paso del diseño personalizado incluye la evaluación del locus genético, el número de copias y la evaluación funcional (es decir, homólogos, evaluación independiente de la diana).

#### 25 *Paso 2: Manipulación de línea celular*

Las células se transfecaron con las nucleasas del Paso 1; este paso se repitió hasta 3 veces para obtener altos niveles de corte y los cultivos se dividieron y los cultivos intermedios se mantuvieron antes de cada transfección. La detección inicial ocurrió varios días después de cada transfección; se probó la eficacia de corte de los grupos de células mediante el ensayo Cel-1. Después del nivel de corte que alcanza niveles aceptables o mesetas después de las transfecciones repetidas, las células se consideraron listas para la clonación de células individuales. Las células agrupadas se clasificaron en una célula por pozo en una placa de 96 pozos; el número de placas para cada grupo dependía de la eficiencia de clonación de células individuales determinada en el Paso 1. Las placas se dejaron incubar durante 3-4 semanas.

#### 35 *Paso 3: Detección y expansión*

Una vez que las células eran confluentes en las placas de 96 pozos, los cultivos se consolidaron y se dividieron en placas triplicadas de 96 pozos; una placa se congeló como respaldo, una placa se volvió a sembrar para continuar la expansión de los clones y la placa final se usó para la confirmación del genotipo. Cada clon en la placa de genotipo se analizó en busca de pérdida de señal qPCR, lo que indica que todos los alelos habían sido modificados. Los clones negativos se amplificaron por PCR y se clonaron para determinar la naturaleza de los indeles y la falta de cualquier tipo salvaje o en marco. Los clones con la anulación confirmada se consolidaron en no más de una placa de 24 pozos y se expandieron aún más; típicamente se produjeron 5-10 crioviales congelados que contenían  $1 \times 10^6$  células por vial para hasta 5 clones individuales por anulación.

#### 45 *Paso 4: Validación*

Las células se depositaron en condiciones asépticas. Los criterios básicos de liberación para todas las células almacenadas incluyeron el número de células viables (antes de congelar y descongelar), confirmación de identidad a través de STR, garantía básica de esterilidad y pruebas de micoplasma; se aplicaron otros criterios de liberación cuando fue necesario (cariotipo, expresión de marcador de superficie, esterilidad de alto nivel, evaluación de eliminación de transcripción o proteína, etc.).

#### **Ejemplo 8 - Anulación de la función CD96 del receptor inhibidor del punto de control a través de iARN**

55 La eliminación de ARNsí de CD96 en células KHYG-1 se realizó por electroporación. El kit Nucleofection se usó junto con Amaxa Nucleofector II, de Lonza, ya que es apropiado para uso con líneas celulares y puede transfectar con éxito tanto células en división como no en división y logra eficiencias de transfección de hasta 90%. Control ARNsí (número de catálogo: sc-37007) y CD96 ARNsí (número de catálogo: sc-45460) se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology. 60 Se usó RPMI-1640 libre de antibióticos que contenía FBS al 10%, L-glutamina 2 mM para el cultivo posterior a la nucleofección. Se obtuvo CD96-APC antihumano de ratón (número de catálogo: 338409) de Biolegend para tinción.

65 Se preparó una solución madre de ARNsí 20 µM. El dúplex ARNsí liofilizado se resuspendió en 33 µl de agua libre de ARNasa (regulador de dilución ARNsí: sc-29527) a control de FITC/control-ARNsí, en 165 µl de agua libre de ARNasa para el gen diana ARNsí (ARNsí CD96). El tubo se calentó a 90°C durante 1 minuto y luego se incubó a 37°C durante 60 minutos. La reserva de ARNsí se almacenó a -20°C hasta que se requirió.

Las células KHYG-1 fueron pasadas uno o dos días antes de la nucleofección, ya que las células deben estar en fase de crecimiento logarítmico. La solución de Nucleofector se calentó a temperatura ambiente (100  $\mu$ l por muestra). Una parte alícuota de medio de cultivo que contenía suero y suplementos también se precalentó a 37°C en un tubo de 50 ml. Se prepararon placas de 6 pozos agregando 1.5 ml de medio de cultivo que contenía suero y suplementos. Las placas se preincubaron en una incubadora humidificada a 37°C/ $CO_2$  al 5%. Se mezclaron suavemente 2x10<sup>6</sup> células en 100  $\mu$ l de solución de nucleofección con 4  $\mu$ l de solución de ARNsi 20  $\mu$ M (1.5  $\mu$ g de ARNsi). Se evitaron las burbujas de aire durante la mezcla. La mezcla se transfirió a cubetas certificadas por Amaxa y se colocó en el soporte de cubetas Nucleofector y se seleccionó el programa U-001. Se permitió que el programa terminara, y las muestras en las cubetas se retiraron inmediatamente. Luego se añadieron 500  $\mu$ l de medio de cultivo preequilibrado a cada cubeta. La muestra en cada cubeta se transfirió luego suavemente a un pozo correspondiente de la placa de 6 pozos preparada, para establecer un volumen final de 2 ml por pozo. Las células fueron incubadas en una incubadora humidificada a 37°C/ $CO_2$  al 5% hasta que se realizó el análisis de transfección. El análisis por citometría de flujo se realizó 16-24 horas después de la electroporación, para medir los niveles de expresión de CD96. Este protocolo de electroporación se llevó a cabo varias veces. Las Figuras 8A y 8B muestran que este protocolo dio como resultado una caída confiable de CD96 801 (intensidad de fluorescencia media de 1107 en 8A; 810 en 8B) en comparación con las células KHYG-1 transfectadas con ARNsi de control 802 (intensidad de fluorescencia media de 2409 en 8A; 3002 en 8B). El isótipo se muestra por 800 802 (intensidad de fluorescencia media de 90 en 8A; 76 en 8B).

#### **20 Ejemplo 9 - Citotoxicidad mejorada de células NK con anulación de CD96**

Las células KHYG-1 con y sin la anulación de CD96 se cultivaron conjuntamente con células K562 a diferentes relaciones efecto: diana (E:T). La citotoxicidad se midió 4 horas después del cocultivo, utilizando el kit de citotoxicidad EuTDA DELFIA de PerkinElmer (número de catálogo: AD0116). Las células diana K562 se cultivaron en medio RPMI-1640 que contenía FBS al 10%, L-glutamina 2 mM y antibióticos. Se compraron placas con fondo en V de 96 pozos (número de catálogo: 83.3926) de SARSTEDT. Se usó una centrífuga Eppendorf 5810R (con rotor de placa) para centrifugar la placa. Se usó un VARIOSKAN FLASH (con el software Scanlt 2.4.3) para medir la señal de fluorescencia producida por las células lisadas K562. Las células K562 se lavaron con medio de cultivo y el número de células se ajustó a 1x10<sup>6</sup> células/ml con medio de cultivo. Se añadieron 2-4 ml de células a 5 $\mu$ l de reactivo BATDA y se incubaron durante 10 minutos a 37°C. Dentro de la célula, los enlaces éster se hidrolizan para formar un ligando hidrofílico, que ya no pasa a través de la membrana. Las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos para lavar las células K562 cargadas. Esto se repitió 3-5 veces con medio que contenía Probenecid 1 mM (Sigma P8761). Después del lavado final, el sedimento celular se resuspendió en medio de cultivo y se ajustó a aproximadamente 5x10<sup>4</sup> células/mL. Se establecieron pozos para la detección de fondo, liberación espontánea y liberación máxima. Se transfirieron 100  $\mu$ L de células diana cargadas (5.000 células) a los pozos en una placa de fondo en V y se agregaron 100  $\mu$ L de células efectoras (células KHYG-1) a concentraciones celulares variables, para producir relaciones efecto a objetivo que varián de 1:1 a 20:1. La placa se centrifugó a 100xg durante 1 minuto y se incubó durante 4 horas en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Para pozos de liberación máxima, se añadieron 10  $\mu$ l de regulador de lisis a cada pozo 15 minutos antes de cosechar el medio. La placa se centrifugó a 500xg durante 5 minutos. Se transfirieron 20  $\mu$ L de sobrenadante a una placa de 96 pozos de fondo plano y se agregaron 200  $\mu$ L de solución de Europio precalentada. Esto se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos usando un agitador de placa. Como las células K562 son lisadas por las células KHYG-1, liberan ligando en el medio. Este ligando luego reacciona con la solución de Europio para formar un quelato fluorescente que se correlaciona directamente con la cantidad de células lisadas. Luego se midió la fluorescencia en un fluorómetro de resolución temporal usando VARIOSKAN FLASH. La liberación específica se calculó utilizando la siguiente fórmula: % de liberación específica = liberación del experimento - liberación espontánea/liberación máxima - liberación espontánea. El análisis estadístico se realizó utilizando el software Graphpad Prism 6.04. Se usó una prueba t pareada para comparar la diferencia entre las células KHYG-1 anuladas de ARNsi CD96 y los grupos de control (n=3). Se descubrió que la liberación específica aumentaba significativamente en los cocultivos que contenían las células KHYG-1 anuladas de CD96. Este fue el caso en todas las relaciones E:T (ver Figura 9). Como la fluorescencia se correlaciona directamente con la lisis celular, se confirmó que anular la expresión de CD96 en las células KHYG-1 dio como resultado un aumento en su capacidad para matar las células diana de cáncer K562.

#### **Ejemplo 10 - Citotoxicidad mejorada de células NK con una anulación de CD328 (Siglec-7)**

55 Anulación mediada por ARNsi de CD328 en células NK-92

##### *Materiales, reactivos e instrumentos*

60 El ARNsi de control (número de catálogo: sc-37007) y el ARNsi de CD328 (número de catálogo: sc-106757) se compraron de Santa Cruz Biotechnology. Para lograr eficiencias de transfección de hasta 90% con alta viabilidad celular (>75%) en células NK-92 con el dispositivo Nucleofector™ (Nucleofector II, Lonza), se usó un Nucleofector™ Kit T de Lonza. Se usó RPMI-1640 que contenía FBS al 10%, L-glutamina 2 mM, libre de antibióticos, para el cultivo post-Nucleofección. El ratón CD328-APC antihumano (número de catálogo: 339206) se compró a Biolegend.

65 *Protocolo*

Preparar 10  $\mu\text{M}$  de solución madre de ARNsi. Resuspender el dúplex ARNsi liofilizado en 66  $\mu\text{l}$  del agua libre de ARNasa (regulador de dilución ARNsi: sc-29527) en FITC-control/control-ARNsi, en 330  $\mu\text{l}$  del agua libre de ARNasa para el gen diana ARNsi (ARNsi CD328). Calentar el tubo a 90°C durante 1 minuto. Incubar a 37°C durante 60 minutos.

5 Almacenar la reserva de ARNsi a -20°C si no se usa directamente. Una muestra de nucleofección contiene (para 100  $\mu\text{l}$  de cubeta estándar). Número de células:  $2 \times 10^6$  células. ARNsi: 4  $\mu\text{l}$  de reserva 10  $\mu\text{M}$ . Solución para nucleofección: 100  $\mu\text{l}$ .

#### *Nucleofección*

10 Cultivar el número requerido de células. (Pases uno o dos días antes de la nucleofección, las células deben estar en fase de crecimiento logarítmico). Preparar ARNsi para cada muestra. Precalentar la solución de Nucleofector a temperatura ambiente (100  $\mu\text{l}$  por muestra). Precalentar una alícuota de medio de cultivo que contenga suero y suplementos a 37°C en un tubo de 50 ml. Preparar placas de 6 pozos llenando con 1.5 ml de medio de cultivo que 15 contenga suero y suplementos y placas preincubadas en una incubadora humidificada a 37°C/5% de CO<sub>2</sub>. Tomar una alícuota de cultivo celular y cuente las células para determinar la densidad celular. Centrifugar el número requerido de 20 células a 1500 rpm durante 5 min. Desechar el sobrenadante por completo para que ningún medio residual cubra el sedimento celular. Resuspender el sedimento celular en solución de nucleofector a temperatura ambiente a una concentración final de  $2 \times 10^6$  células/100  $\mu\text{l}$ . Evitar almacenar la suspensión celular durante más de 15-20 minutos en la solución Nucleofector, ya que esto reduce la viabilidad celular y la eficiencia de transferencia de genes. Mezclar 100  $\mu\text{l}$  de suspensión celular con ARNsi. Transferir la muestra a una cubeta certificada Amaxa. Asegurarse de que la muestra cubra el fondo de la cubeta, evitar las burbujas de aire mientras se pipetea. Cerrar la cubeta con la tapa azul. Seleccionar el programa Nucleofector apropiado (A-024 para las células NK-92). Insertar la cubeta en el soporte de la cubeta (Nucleofector II: girar el carrusel en sentido horario hasta la posición final) y presionar el botón "x" para iniciar 25 el programa. Para evitar daños a las células, retirar las muestras de la cubeta inmediatamente después de que el programa haya finalizado (la pantalla muestra "OK"). Agregar 500  $\mu\text{l}$  del medio de cultivo precalentado a la cubeta y transferir la muestra a la placa preparada de 6 pozos. Incubar las células en una incubadora humidificada a 37°C/CO<sub>2</sub> al 5%. Realizar el análisis por citometría de flujo y el ensayo de citotoxicidad después de 16-24 horas.

#### **Resultados**

30 Se siguió el protocolo anterior y se realizó análisis por citometría de flujo del nivel de expresión de CD328 en células NK-92. Los resultados de un experimento representativo se muestran en la Figura 10, confirmando la eliminación exitosa (intensidad de fluorescencia media de 3048 para el control ARNsi 1001; 679 para CD328 ARNsi 1002).

#### **Anular CD328 mejora la citotoxicidad**

##### *Materiales, reactivos e instrumentos*

40 El kit de citotoxicidad EuTDA DELFIA basado en ligando potenciador de fluorescencia (número de catálogo: AD0116) se compró a PerkinElmer. Las células diana K562 se cultivaron en medio RPMI-1640 que contenía FBS al 10%, L-glutamina 2 mM y antibióticos. Se compraron placas con fondo en V de 96 pozos (número de catálogo: 83.3926) de SARSTEDT. Se usó la centrífuga Eppendorf 5810R (con rotor de placa) para girar la placa hacia abajo. Se usó VARIOSKAN FLASH (con el software Scanlt 2.4.3) para medir la señal de fluorescencia producida por las células lisadas K562.

##### *Protocolo*

50 Cargar las células K562 diana con el reactivo ligando potenciador DELFIA BATDA de fluorescencia. Lavar células K562 con medio, ajustar el número de células a  $1 \times 10^6$  células/mL con medio de cultivo. Añadir 2-4 mL de células a 5  $\mu\text{l}$  de reactivo BATDA, incubar durante 10 minutos a 37°C. Se centrifuga a 1500 rpm durante 5 minutos para lavar las células K562 cargadas durante 3-5 veces con medio que contiene probenecid 1 mM (Sigma P8761). Despues del lavado final, resuspender el sedimento celular en medio de cultivo y ajustar a aproximadamente  $5 \times 10^4$  células/mL.

##### *Ensayo de citotoxicidad*

60 Establecer pozos para la detección de fondo, liberación espontánea y liberación máxima. Pipetar 100  $\mu\text{L}$  de células diana cargadas (5.000 células) en una placa de fondo en V. Agregar 100  $\mu\text{L}$  de células efectoras (NK-92) de diferentes concentraciones celulares. La relación de efector a diana varía de 1:1 a 20:1. Girar la placa a 100x g de RCF durante 1 minuto. Incubar durante 2 horas en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Para pozos de máxima liberación, agregar 10  $\mu\text{L}$  de regulador de lisis a cada pozo 15 minutos antes de cosechar el medio. Girar la placa a 500x g durante 5 minutos. Transferir 20  $\mu\text{L}$  de sobrenadante a una placa de 96 pozos de fondo plano, agregar 200  $\mu\text{L}$  de solución de Europio precalentada, incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos usando un agitador de placas. Medir la fluorescencia en un fluorómetro con resolución temporal utilizando VARIOSKAN FLASH. La liberación específica se calculó utilizando la siguiente fórmula: % de liberación específica = liberación del experimento - liberación espontánea/liberación máxima - liberación espontánea

## Resultados

5 Se siguió lo anterior para determinar el efecto sobre la citotoxicidad de la anulación de CD328. Los resultados de un experimento representativo se muestran en la Figura 11. Como se ve, la citotoxicidad contra las células diana aumentó en las células con la eliminación de CD328.

10 **Ejemplo 11 - Protocolo para la terapia del cáncer de la sangre mediante anulación/anulación de los receptores inhibidores del punto de control**

15 Como se demostró en los ejemplos anteriores, la función del receptor inhibidor del punto de control se puede eliminar o eliminar de varias maneras. El siguiente protocolo fue desarrollado para uso en el tratamiento de pacientes con cáncer de sangre: después del diagnóstico de un paciente con un cáncer tratado de manera adecuada con la invención, una alícuota de células NK modificadas puede descongelarse y cultivarse antes de la administración al paciente. Alternativamente, se puede preparar una mutación transitoria utilizando, por ejemplo, ARNs si en un día o dos, como se describió anteriormente. La plataforma de electroporación de flujo MaxCyte ofrece una solución adecuada para lograr transfecciones rápidas a gran escala en la clínica. La eliminación de ciertos receptores inhibitorios del punto de control puede ser más beneficioso que otros. Es probable que esto dependa del paciente y el cáncer. Por esta razón, el cáncer se biopsia opcionalmente y las células cancerosas se cultivan en cultivo ex vivo. Por lo tanto, se puede analizar una variedad de células NK con diferentes modificaciones del receptor inhibidor del punto de control para determinar la citotoxicidad contra el cáncer específico. Este paso se puede usar para seleccionar la célula NK más apropiada o un derivado de la misma para la terapia. Después de una modificación exitosa, las células se resuspenden en un vehículo adecuado (por ejemplo, solución salina) para inyección intravenosa y/o intratumoral en el paciente.

20 **Ejemplo 12 -Activación con KHYG-1 de la variante TRAIL/TRAIL**

25 Las células KHYG-1 se transfecaron tanto con TRAIL como con la variante TRAIL, con el fin de evaluar su viabilidad y capacidad para matar las células cancerosas después de la transfección. La variante TRAIL utilizada es la descrita en el documento WO 2009/077857. Está codificada por el gen TRAIL de tipo salvaje que contiene la mutación D269H/E195R. Esta mutación aumenta significativamente la afinidad de la variante TRAIL por DR5, al tiempo que reduce la afinidad por ambos receptores señalero (DcR1 y DcR2).

30 **Expresión de línea base TRAIL**

35 La expresión de la línea de base TRAIL (CD253) en células KHYG-1 se ensayó usando citometría de flujo. Se usaron CD253-APC antihumano de ratón (número de catálogo de Biolegend: 308210) y control de isotipo (número de catálogo Biolegend: 400122) para teñir muestras de células y se analizaron en un citómetro de flujo BD FACS Canto II. Las células KHYG-1 se cultivaron en medio RPMI 1640 que contenía FBS al 10%, L-glutamina 2 mM, penicilina (100 U/mL)/estreptomicina (100 mg/mL) e IL-2 (10 ng/mL). Se recogieron  $0.5\text{--}1.0 \times 10^6$  células/prueba por centrifugación (1500 rpm x 5 minutos) y se aspiró el sobrenadante. Las células (suspensión de células individuales) se lavaron con 4 mL de regulador FACS helado (PBS, 0.5-1% de BSA, 0.1% de azida de sodio NaN<sub>3</sub>). Las células se resuspendieron en 100  $\mu\text{L}$  de regulador FACS helado, se añadieron 5  $\mu\text{L}$  de anticuerpo a cada tubo y se incubaron durante 30 minutos en hielo. Las células se lavaron 3 veces por centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos. Las células se volvieron a suspender en 500  $\mu\text{L}$  de regulador FACS helado y se mantuvieron temporalmente en la oscuridad sobre hielo. Las células se analizaron posteriormente en el citómetro de flujo (BD FACS Canto II) y los datos generados se procesaron utilizando el software FlowJo 7.6.2. Como se puede ver en la Figura 12, el análisis FACS mostró una expresión de línea base débil de TRAIL en la superficie celular KHYG-1.

40 **Activación TRAIL/variante TRAIL por electroporación**

45 El ARNm de TRAIL salvaje y el ARNm de la variante de TRAIL (D269H/195R) fueron sintetizados por TriLink BioTechnologies, divididos en alícuotas y almacenados a -80°C. Se usaron anticuerpos de ratón anti-humano CD253-APC (número de catálogo de Biolegend: 308210) y control de isotipo (número de catálogo de Biolegend: 400122), y ratón anti-humano CD107a-PE (número de catálogo de eBioscience: 12-1079-42) y control de isotipo (catálogo de eBioscience número: 12-4714) para teñir muestras de células y se analizaron en un citómetro de flujo BD FACS Canto II. Se usó colorante de ADN SYTOX-Green (número de catálogo de Life Technologies: S7020; Solución 5 mM en DMSO). Para lograr eficiencias de transfección de hasta 90% con alta viabilidad celular en células KHYG-1 con el dispositivo Nucleofector™ (Nucleofector II, Lonza), se usó un Nucleofector™ Kit T de Lonza. Se usó RPMI 1640 libre de antibióticos que contenía FBS al 10%, L-glutamina (2 mM) e IL-2 (10 ng/ml) para el cultivo postnucleofeción.

50 Las células KHYG-1 y NK-92 fueron pasadas uno o dos días antes de la nucleofeción, ya que las células deben estar en la fase de crecimiento logarítmico. La solución para el Nucleofector se precalentó a temperatura ambiente (100  $\mu\text{l}$  por muestra), junto con una alícuota de medio de cultivo que contenía suero y suplementos a 37°C en un tubo de 50 mL. Se prepararon placas de 6 pozos llenando con medio de cultivo de 1.5 mL que contenía suero y suplementos y se incubaron previamente en una incubadora humidificada a 37°C/5% de CO<sub>2</sub>. Se preparó una alícuota de cultivo celular y se contaron las células para determinar la densidad celular. El número requerido de células se centrifugó a

- 1500 rpm durante 5 minutos, antes de desechar el sobrenadante por completo. El sedimento celular se resuspendió en solución de nucleofector a temperatura ambiente a una concentración final de  $2 \times 10^6$  células/100  $\mu\text{l}$  (tiempo máximo en suspensión = 20 minutos). Se mezclaron 100  $\mu\text{l}$  de suspensión celular con 10  $\mu\text{g}$  de ARNm (volumen de ARN <10  $\mu\text{l}$ ). La muestra se transfirió a una cubeta certificada por Amaxa (asegurándose de que la muestra cubriera el fondo de la cubeta y evitando burbujas de aire). Se seleccionó el programa Nucleofector apropiado (es decir, U-001 para células KHYG-1). Luego se insertaron las cubetas en el soporte de cubetas. Se añadieron 500  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo precalentado a la cubeta y la muestra se transfirió a una placa preparada de 6 pozos inmediatamente después de que el programa había terminado, para evitar daños a las células. Las células se incubaron en una incubadora humidificada a 37°C/CO<sub>2</sub> al 5%. El análisis por citometría de flujo y los ensayos de citotoxicidad se realizaron 12-16 horas después de la electroporación. La tinción por citometría de flujo se llevó a cabo como anteriormente. Como se puede ver en las Figuras 13 y 14, la expresión de la variante TRAIL/TRAIL y CD107a (marcador de activación NK) aumentó después de la transfección, lo que confirma el éxito de la inserción de los genes TRAIL en las células KHYG-1.
- La Figura 15 proporciona evidencia de la viabilidad de células KHYG-1 antes y después de la transfección por electroporación. Se puede observar que no se observan diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad celular después de la transfección de las células con la variante TRAIL/TRAIL, lo que confirma que la expresión del tipo salvaje o la variante TRAIL no es tóxica para las células. Esta observación contradice los hallazgos correspondientes en las células NK-92, lo que sugiere que la activación del gen de la variante TRAIL es tóxica para las células (datos no mostrados). Sin embargo, esto probablemente se explica por los niveles de expresión relativamente altos de los receptores DR4 y DR5 de TRAIL en la superficie celular NK-92 (ver Figura 16).

#### Efectos de la variante TRAIL/TRAIL sobre la citotoxicidad celular KHYG-1

- Se usó anticuerpo anti-CD2-APC humano de ratón (número de catálogo BD Pharmingen: 560642). Se usó el anticuerpo Anexina V-FITC (número de catálogo de ImmunoTools: 31490013). Se usó tinte de ADN SYTOX-Green (número de catálogo de Life Technologies: S7020). Se usó una placa de cultivo celular de 24 pozos (número de catálogo SARSTEDT AG: 83.3922). La línea celular de leucemia mielógena K562, la línea celular de mieloma múltiple RPMI8226 y MM1.S se usaron como células diana. K562, RPMI8226, MM1.S se cultivaron en medio RPMI 1640 que contenía FBS al 10%, L-glutamina 2 mM y penicilina (100 U/ml)/estreptomicina (100 mg/mL). Como se explicó anteriormente, las células KHYG-1 se transfectaron con TRAIL/variante TRAIL. Las células diana se lavaron y sedimentaron mediante centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos. Las células KHYG-1 transfectadas se diluyeron a  $0.5 \times 10^6$ /mL. La densidad celular objetivo se ajustó luego en medio RPMI 1640 precalentado, para producir relaciones efector:diana (E:T) de 1:1. Luego se mezclaron 0.5 mL de células KHYG-1 y 0.5 mL de células diana en una placa de cultivo de 24 pozos y se colocaron en una incubadora humidificada a 37°C/5% de CO<sub>2</sub> durante 12 horas. El análisis por citometría de flujo se usó luego para analizar la citotoxicidad de células KHYG-1; las células cocultivadas (en diferentes puntos de tiempo) se lavaron y luego se tiñeron con anticuerpo CD2-APC (5  $\mu\text{L}$ /prueba), Anexina V-FITC (5  $\mu\text{L}$ /prueba) y SYTOX-Green (5  $\mu\text{L}$ /prueba) usando Anexina V regulador de unión. Los datos se analizaron adicionalmente utilizando el software FlowJo 7.6.2. Se establecieron puertas CD2-positivas y CD2-negativas, que representan las células KHYG-1 y las poblaciones de células diana, respectivamente. Las células positivas para anexina V-FITC y SYTOX-Green en la población negativa para CD2 se analizaron para detectar apoptosis inducida por TRAIL.

- Las Figuras 17, 18 y 19 muestran los efectos de ambas células KHYG-1 que expresan la variante TRAIL o TRAIL sobre la apoptosis para las tres líneas celulares diana: K562 (Figura 17), RPMI8226 (Figura 18) y MM1.S (Figura 19). Es evidente para todas las poblaciones de células diana que la expresión de TRAIL en las células KHYG-1 aumentó el nivel de apoptosis, en comparación con las células KHYG-1 normales (no transfectadas con TRAIL). Además, la expresión de la variante TRAIL en las células KHYG-1 aumentó aún más la apoptosis en todas las líneas celulares diana, en comparación con las células KHYG-1 transfectadas con TRAIL de tipo salvaje.

- Las células de la invención, que expresan la variante TRAIL, ofrecen una ventaja significativa en la terapia contra el cáncer, debido a que exhiben afinidades más altas por el receptor de muerte DR5. Cuando estas células de la invención los desafían, se impide que las células cancerosas desarrollen estrategias defensivas para evitar la muerte a través de una determinada vía. Por lo tanto, los cánceres no pueden eludir eficazmente la muerte celular inducida por TRAIL regulando al alza los receptores señalero TRAIL, ya que las células de la invención se modifican para que permanezcan citotóxicas en esas circunstancias.

#### ***Ejemplo 13 - Protocolo para la terapia del cáncer de la sangre usando células NK con variantes TRAIL incorporadas***

- Las células KHYG-1 se transfectaron con la variante TRAIL, como se describe anteriormente en el Ejemplo 6. El siguiente protocolo se desarrolló para uso en el tratamiento de pacientes con cáncer de sangre:
- Después del diagnóstico de un paciente con un cáncer tratado de manera adecuada con la invención, un agente inductor de DR5, por ejemplo, Bortezomib se administra antes de la administración de las células NK modificadas y, por lo tanto, se usa en dosis bajas para regular al alza la expresión de DR5 en el cáncer, haciendo que la terapia con células NK modificadas sea más efectiva. Una parte alícuota de células NK modificadas se descongela, se cultiva y

se administra al paciente. Dado que la variante TRAIL expresada por las células NK utilizadas en la terapia tiene una afinidad menor por los receptores señalados que el TRAIL de tipo salvaje, existe un aumento de la unión de los receptores de muerte en la superficie de las células cancerosas y, por lo tanto, una mayor apoptosis de las células cancerosas.

5 Otra opción, antes de la implementación del protocolo anterior, es tomar una biopsia del cáncer y cultivar células cancerosas ex vivo. Este paso se puede utilizar para identificar aquellos cánceres que expresan niveles particularmente altos de receptores señalados y/o niveles bajos de receptores de señal, para ayudar a determinar si un agente inductor de DR5 es apropiado para un paciente dado. Este paso también se puede llevar a cabo durante la terapia con el protocolo anterior, ya que un cáncer dado podría ser capaz de adaptarse a, por ejemplo, reducir su expresión de DR5 y, por lo tanto, puede volverse adecuado para tratar con un agente inductor de DR5 en la mitad del tratamiento.

10

**Ejemplo 14 - Efecto de la inhibición del proteasoma sobre la citotoxicidad mediada por TRAIL de células NK**

15 El bortezomib (Bt) es un inhibidor del proteasoma (fármaco similar a la quimioterapia) útil en el tratamiento del mieloma múltiple (MM). Se sabe que el bortezomib regula al alza la expresión de DR5 en varios tipos diferentes de células cancerosas, incluidas las células MM. Las células KHYG-1 se transfecaron con la variante TRAIL, como se describió anteriormente en el Ejemplo 12, antes de usarse para atacar células MM con o sin exposición a Bortezomib.

20 Expresión DR5 inducida por bortezomib

Bortezomib fue comprado de Millennium Pharmaceuticals. El antígeno de ratón anti-humano DR5-AF647 (número de catálogo: 565498) fue comprado a BD Pharmingen. Las muestras de células teñidas se analizaron en BD FACS Canto II. El protocolo incluyó: (1) Se cultivaron líneas celulares MM RPMI8226 y MM1.S en medio RPMI1640 (Sigma, St Louis, MO, Estados Unidos) suplementado con L-glutamina 2 mM, HEPES 10 mM, bicarbonato de sodio 24 mM, 0.01% de antibióticos y suero bovino fetal al 10% (Sigma, St Louis, MO, Estados Unidos), en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C. (2) Se sembraron células MM en placas de 6 pozos a 1x10<sup>6</sup>/mL, 2 mL/pozo. (3) Las células MM fueron tratadas con diferentes dosis de Bortezomib durante 24 horas. (4) La expresión de DR5 en células MM tratadas/no tratadas con Bortezomib se analizó luego por citometría de flujo (Figura 20). Como se muestra en la Figura 20, se encontró que el tratamiento con dosis bajas de Bortezomib aumenta la expresión de DR5 en ambas líneas celulares MM: en células RPMI 8226 (arriba) de un MFI de 273 a 679 con Bortezomib de 10 nm; en células MM1.S (abajo) de un MFI de 214 a 662 con 2.5 nm de Bortezomib. La sobreexpresión de DR5 se asoció con una inducción menor de apoptosis (datos no mostrados). Sin embargo, se descubrió que la expresión de DR5 no podía regularse por las altas dosis de Bortezomib, debido a la alta toxicidad que resulta en la muerte de la mayoría de las células MM.

35 Sensibilización inducida por bortezomib de células cancerosas

Las células KHYG-1 se transfecaron con la variante TRAIL (TRAIL D269H/E195R), como se describe anteriormente en el Ejemplo 12. El protocolo implicó los siguientes pasos (1) Las células MM1.S tratadas/no tratadas con Bortezomib se usaron como células diana. Las células MM1.S se trataron con 2.5 nM de Bortezomib (columna derecha) o vehículo (columna izquierda) durante 24 horas. (2) 6 horas después de la electroporación del ARNm variante TRAIL, las células KHYG-1 se cultivaron luego con células MM en una placa de 12 pozos. Despues del lavado, las concentraciones celulares se ajustaron a 1x10<sup>6</sup>/mL, antes de mezclar las células KHYG-1 y MM1.S a una relación 1:1 con respecto al cultivo durante 12 horas. (3) Se realizó un análisis citométrico de flujo de la citotoxicidad de las células KHYG-1. Las células cocultivadas se recogieron, se lavaron y luego se tiñeron con anticuerpo CD2-APC (5 µL/prueba), AnnexinV-FITC (5 µL/prueba) y SYTOX-Green (5 µL/prueba) usando regulador de unión anexina V. (4) Los datos se analizaron adicionalmente utilizando el software FlowJo 7.6.2. La población CD2 negativa representa las células MM1.S. Las células KHYG-1 son fuertemente positivas para CD2. Finalmente, se analizaron las células positivas para AnnexinV-FITC y SYTOX-Green en la población negativa para CD2. El análisis citométrico de flujo de la apoptosis se realizó en células MM1.S pretratadas/no tratadas con Bortezomib cocultivadas con células KHYG-1 sometidas a electroporación con/sin variante TRAIL. Como se muestra en la Figura 21, se encontró que Bortezomib indujo la sensibilidad de las células MM a las células KHYG-1 que expresan la variante TRAIL (47.9% de muerte a 70.5% de muerte) en mayor medida que a las células que expresan el tipo salvaje TRAIL (41.8% de muerte a 51.4% de asesinatos). Por lo tanto, los datos indicaron que un agente que indujo la expresión de DR5 fue eficaz en el modelo para aumentar la citotoxicidad contra las células cancerosas y, por lo tanto, puede ser útil para mejorar la terapia contra el cáncer de la presente invención.

**Ejemplo 15 - Generación de constructos CAR**

60 Las regiones codificantes de cadena pesada y ligera variables se clonaron en los vectores basados en pcDNA3.3 (Invitrogen) p33G1f y p33Kappa, respectivamente. Todos los anticuerpos de baja afinidad se produjeron en condiciones libres de suero cotransfектando individualmente cadenas pesadas (SEQ ID No 1) a partir de los anticuerpos CD38 de alta afinidad (descritos en WO2011154453 y WO2006099875) y cadenas ligeras a partir de vectores de expresión aleatorios de cadena ligera de línea germinal en HEK293F células que usan 293 fectina (Invitrogen), como se describió previamente (Vink et al. 2014). Se recogieron los sobrenadantes libres de células y se determinaron las concentraciones de anticuerpos mediante cuantificación Octet IgG (Forté Bio). Este intercambio de

cadena ligera da como resultado anticuerpos (en este caso scFvs) que tienen una afinidad reducida por CD38 en comparación con Daratumumab.

- 5 Las afinidades se midieron y clasificaron usando interferometría de biocapa en un instrumento Octet HTX (ForteBio). Los biosensores de captura Fc anti-IgG humana (ForteBio) se cargaron durante 1000 s con IgG humana tipo 1 (hIgG1) que contenía diferentes combinaciones de cadenas pesadas y ligeras dirigidas contra CD38. Después de una línea de base (100 s), se determinó la asociación (1.000 s) y la disociación (1.000 s) del dominio extracelular del CD38 marcado con His N-terminal (His-CD38, 100 nM) en el diluyente de muestra (ForteBio). Para los cálculos, se utilizó la masa molecular teórica de His-CD38 basada en la secuencia de aminoácidos, es decir, 30.5 kDa. Los experimentos se llevaron a cabo mientras se agitaba a 1.000 rpm y 30°C. Los datos se analizaron con el software Data Analysis v8.0 (ForteBio) usando el modelo 1:1 y un ajuste local completo, con 1.000 s de tiempo de asociación y 250 s de tiempo de disociación. Las trazas de datos se corrigieron restando el promedio de cuatro biosensores de referencia cargados con IgG1-3003-028 WT e incubados solo con diluyente de muestra. El eje y se alineó con los últimos 5 s de la línea de base, y se aplicó la corrección entre pasos, así como el filtrado Savitzky-Golay.

Los ensayos de unión homogénea para anticuerpos específicos de CD38 humanos se realizaron en placas de microtitulación de 1.536 pozos en respuesta a la dosis usando un manipulador de líquido Tecan Evo 200. La unión de los anticuerpos IgG1 a las células CHO que expresan transitoriamente CD38 humano, control de fondo de CHO wt, y se detectaron perlas de estreptavidina recubiertas con CD38 humano biotinilado purificado e inhibido con un conjugado polyclonal IgG de cabra anti-humano IgG(Fc)-Alexa Fluor 647 secundario (Jackson ImmunoResearch). Paralelamente, también se evaluó la unión de los anticuerpos IgG1 a las cuentas de estreptavidina recubiertas con CD38 humano biotinilado y purificado, también se evaluó CD38 usando un conjugado Fab anti-humano IgG (H+L)-DyLight 649 secundario monovalente de cabra (Jackson ImmunoResearch). Las muestras de IgG1 se normalizaron y diluyeron en medio de expresión Freestyle 293 (GIBCO). Se añadieron 2 mL de muestra diluida a 5 mL de suspensiones celulares o de perlas que contenían conjugados secundarios a 200 ng/mL de conjugado IgG o 300 ng/mL de conjugado Fab, respectivamente. Las suspensiones celulares se prepararon en regulador FMAT (PBS, BSA al 0.1% y azida de sodio al 0.02%) + Pluronic F-68 al 0.075%. Se prepararon suspensiones de perlas en HBB (HEPES 10 mM [pH 7.4], NaCl 150 mM, KCl 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM, BSA al 0.5% y azida sódica al 0.01% + Pluronic F-68 al 0.075%).

20 Después de 8 horas de incubación a temperatura ambiente (RT) en la oscuridad, se registraron las señales de fluorescencia utilizando el Sistema de Detección Celular 8200 de Applied Biosystems (ThermoFisher Scientific), con un valor de corte de 50 recuentos aplicado. Los datos de intensidad de fluorescencia total obtenidos se procesaron y visualizaron usando el software ActivityBase (IDBS).

25 35 La cadena ligera variable seleccionada B1 (SEQ ID NO: 23) y la cadena pesada variable (SEQ ID NO: 1) se amplificaron usando PCR con cebadores (SEQ ID NO: 8-22) que contienen brazos de homología, y el conjunto Gibson (NEB) se usó para combinar ambas cadenas unidas con un enlazador G4S. Los scFv generados se clonaron en un vector retroviral SFG, seguido de un dominio transmembrana CD8a y uno de los dominios coestimuladores mencionados a continuación, como se describe para las células T en Zhao et al. (2015) Los constructos CAR se 40 unieron mediante una secuencia 2A a una secuencia truncada de NGFR o dsRed (Kim et al. 2011).

#### **Ejemplo 16 - Generación de partículas retrovirales**

45 Se transfecaron células de empaquetamiento Phoenix-Ampho con los constructos CAR, los vectores gag-pol (pHIT60) y envolvente (pCOLT-GALV) (Roche). 2 y 3 días después de la transfección, se recogieron los sobrenadantes libres de células que contenían partículas retrovirales y se usaron directamente para la transducción.

50 Las células KHYG-1 se transdijeron retroviralmente usando rotoinoculación en placas recubiertas con retronectina (Takara). Se realizó una segunda transducción después de 16 h. 72 horas después de la transducción, la expresión de CD38 se determinó por citometría de flujo. Las células KHYG-1 transducidas se cultivaron. 1 semana después, las células NK transducidas con CAR se estimularon con células UM9 irradiadas (5 Gy) (relación efecto a objetivo [E:T] 1:3) o se probaron funcionalmente.

#### **Ejemplo 17 - Células primarias de pacientes con MM e individuos sanos**

55 60 Se aislaron células mononucleares BM (CMN) que contenían 5%-40% de células plasmáticas malignas de aspirados de BM de pacientes con MM mediante centrifugación de densidad Ficoll-Paque y se usaron directamente o se criconservaron en nitrógeno líquido hasta su uso. Las PBMC/MNC se aislaron de capas Buffy de donantes de bancos de sangre sanos mediante centrifugación de densidad Ficoll-Paque. Todas las muestras primarias se obtuvieron después del consentimiento informado y la aprobación del comité de ética médica.

#### **Ejemplo 18 - Citotoxicidad mejorada de células NK que expresan CD38-CAR**

65 Se cultivaron células KHYG-1 con y sin un receptor de antígeno químérico de baja afinidad para CD38 (CD38-CAR) conjuntamente con células UM9 en diferentes relaciones efecto:diana (E:T). Se probaron tres variantes de las células CD38-CAR KHYG-1: BBz B1, 28z B1 y 28z BBL B1; estas variantes corresponden a los dominios coestimuladores

41BB-CD3zeta, CD28-CD3zeta y CD28/4-1BB más ligando, respectivamente (41BB = SEQ ID NO: 42; CD3zeta = SEQ ID NO: 41; y CD28 = SEQ ID NO: 43)

- 5 La citotoxicidad se midió 4 horas después del cocultivo, usando el kit de citotoxicidad EuTDA DELFIA de PerkinElmer (número de catálogo: AD0116). Las células diana UM9 se cultivaron en medio RPMI-1640 que contenía FBS al 10%, L-glutamina 2 mM y antibióticos. Se compraron placas con fondo en V de 96 pozos (número de catálogo: 83.3926) de SARSTEDT. Se usó una centrífuga Eppendorf 5810R (con rotor de placa) para centrifugar la placa. Se usó un VARIOSKAN FLASH (con el software Scanlt 2.4.3) para medir la señal de fluorescencia producida por las células lisadas UM9. Las células UM9 se lavaron con medio de cultivo y el número de células se ajustó a  $1 \times 10^6$  células/mL con medio de cultivo. Se añadieron 2-4 mL de células a 5 µl de reactivo BATDA y se incubaron durante 10 minutos a 37°C. Dentro de la célula, los enlaces éster se hidrolizan para formar un ligando hidrofílico, que ya no pasa a través de la membrana. Las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos para lavar las células UM9 cargadas. Esto se repitió 3-5 veces con medio que contenía Probenecid 1 mM (Sigma P8761). Después del lavado final, el sedimento celular se resuspendió en medio de cultivo y se ajustó a aproximadamente  $5 \times 10^4$  células/mL. Se establecieron pozos para la detección de fondo, liberación espontánea y liberación máxima. Se transfirieron 100 µl de células diana cargadas (5.000 células) a los pozos en una placa de fondo en V y se agregaron 100 µl de células efectoras (células KHYG-1) a concentraciones celulares variables, para producir relaciones E:T que varían de 0.5:1 a 2:1. La placa se centrifugó a 100x g durante 1 minuto y se incubó durante 4 horas en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Para pozos de liberación máxima, se añadieron 10 µl de regulador de lisis a cada pozo 15 minutos antes de cosechar el medio. La placa se centrifugó a 500 x g durante 5 minutos. Se transfirieron 20 µl de sobrenadante a una placa de 96 pozos de fondo plano y se agregaron 200 µl de solución de Europio precalentada. Esto se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos usando un agitador de placa. Como las células UM9 son lisadas por las células KHYG-1, liberan ligando en el medio. Este ligando luego reacciona con la solución de Europio para formar un quelato fluorescente que se correlaciona directamente con la cantidad de células lisadas. Luego se midió la fluorescencia en un fluorómetro de resolución temporal usando VARIOSKAN FLASH. La liberación específica se calculó utilizando la siguiente fórmula: % de liberación específica = liberación del experimento - liberación espontánea/liberación máxima - liberación espontánea. El análisis estadístico se realizó utilizando el software Graphpad Prism 6.04. Se usó una prueba t pareada para comparar la diferencia entre las células CD38-CAR KHYG-1 y los grupos de control.

#### Ensayo de citotoxicidad basado en imágenes bioluminiscentes

- 35 Para determinar la lisis de líneas celulares malignas humanas transducidas con Luc-GFP por células CD38 CAR NK 7-10 días después de la transducción, se incubaron conjuntamente diluciones en serie de células simuladas o CD38-CAR NK con las líneas celulares malignas. La señal de luciferasa producida por las células malignas supervivientes se determinó después de 16-24 h con un luminómetro de microplacas GloMax 96 (Promega) dentro de los 15 minutos posteriores a la adición de 125 mg/mL de escarabajo lucifera (Promega). % de células de lisis = 1 (señal de imagen de bioluminiscencia [BLI] en pozos tratados/señal BLI en pozos no tratados) 100%.
- 40 Se descubrió que la liberación específica aumentaba significativamente en los cocultivos que contenían las células CD38-CAR KHYG-1, a pesar de que solo alrededor del 50% de las células se transducían con éxito. Este fue el caso en todas las relaciones E:T, excepto para las células CD38-CAR KHYG-1 con el dominio coestimulador 41BB-CD3zeta en una relación E:T de 0.5:1 (ver Figura 22). Se esperarían efectos citotóxicos más potentes en muestras de mayor pureza de las células efectoras que llevan los CD38-CAR. Como la fluorescencia se correlaciona directamente con la lisis celular, se confirmó que la expresión de CD38-CAR en las células KHYG-1 dio como resultado un aumento en su capacidad para matar las células diana de cáncer UM9.

#### Ensayo de citotoxicidad basado en citometría de flujo

- 50 7-10 días después de la transducción, se incubaron diluciones en serie de células CD38-CAR-KHYG-1 con BM-MNC o PBMC marcadas con trazador violeta (Thermo Fisher) durante 14 h. Después de la adición de fluoroesferas de recuento de flujo (Beckman 7547053), las células se cosecharon y se tiñeron para CD38 y/o CD138. Las células viables se analizaron cuantitativamente a través de mediciones equalizadas de recuento de flujo. El porcentaje de lisis celular se calculó de la siguiente manera y solo si la población de células diana analizadas contenía >500 células viables en las muestras no tratadas: % de células de lisis = 1 (número absoluto de células diana viables en pozos tratados/número absoluto de células diana viables en pozos no tratados) 100%.
- 55 Se usaron dos tipos de puertas para analizar las células MM primarias: células CD138+/CD38+ muy brillantes frente a todas las células CD138+/CD38 (véanse las Figuras 25 y 26). Hubo una mínima diferencia no significativa en los resultados entre subconjuntos. Las células MM primarias fueron susceptibles a la muerte celular inducida por CD38-CAR-KHYG-1. Como se ve en las Figuras 23 y 24, se observó la destrucción más significativa de células MM primarias cuando se usaban CAR que contenían zeta CD28-CD3 (28z B1). Se observó una destrucción mínima o nula de las células CD38+/CD138- (células que expresan CD38 no malignas normales) (véanse las figuras 25 y 26), por lo tanto, las células no parecían ser el blanco de las células CAR-NK.

Por lo tanto, se ha demostrado que las células CAR-NK CD38 de 'baja afinidad' tienen la capacidad de atacar y matar células cancerosas que expresan CD38 sin causar efectos adversos fuera del objetivo en las células normales no malignas que expresan CD38.

Si bien las realizaciones preferidas de la presente invención se han mostrado y descrito en el presente documento, será obvio para los expertos en la materia que tales realizaciones se proporcionan solo a modo de ejemplo. Ahora surgirán numerosas variaciones, cambios y sustituciones ante los expertos en la técnica sin apartarse de la invención. Debe entenderse que pueden emplearse diversas alternativas a las realizaciones de la invención descritas en la presente memoria en la práctica de la invención.

## SECUENCIA IDS

SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos o ADN
1	QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKAFGGTFSSYAIWVRQAPGQGLEWMGRIIRFL GIANYAQKFQGRVTLIADKSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGEPGERDPDAVDIW GQGTMTVSS
2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIK
3	QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKPSGGTFRSYAIWVRQAPGQGLEWMGRIIVFL GKVNAYAQRFQGRVTLTADKSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCTGEPGARDPDAFDI WGQGTMTVSS
4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIK
5	QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKAFGGTFSSYAIWVRQAPGQGLEWMGRIIRFL GKTNHAQKFQGRVTLTADKSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGEPGDRDPDAVDI WGQGTMTVSS
6	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIK
7	EVQLVQSGAEVKPGESLKISKCGSGYSFSNYWIGWVRQMPGKGLEWMGIYPHD SDARYSPSFQGQVTFSAKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARHVGWGSRYWYF DLWGRGTLTVSS
8	CTGCTGCTGCATCGGGCGCGCCCGGACATCCAGATGACCCAGAGC
9	CTGCTGCTGCATCGGGCGCGCCCGGACATCCAGCTGACCCAGAGC
10	CTGCTGCTGCATCGGGCGCGCCCGGACATCCAGCTGACCCAGAGC
11	CTGCTGCTGCATCGGGCGCGCCCGGAGATCTGCTGACCCAGAGC
12	CTGCTGCTGCATCGGGCGCGCCCGGAGATCTGATGACCCAGAGC
13	CTGCTGCTGCATCGGGCGCGCCCGGAGATCTGATGACCCAGAGC
14	CTGCTGCTGCATCGGGCGCGCCCGGACATCTGATGACCCAGAGC
15	GCGGCGGAGGATCTGGGGAGGCGGCTCTAGGTGCAGCTGGTGAGAGCG
16	GCGGCGGAGGATCTGGGGAGGCGGCTCTGAAGTGCAGCTGGTGAGCTG G
17	CAGATCCTCCGCCAGATCCGCCTCCGCCCTTGATCTCACCTTGGTGC
18	CAGATCCTCCGCCAGATCCGCCTCCGCCCTTGATTCCAGCTGGTGC
19	CAGATCCTCCGCCAGATCCGCCTCCGCCCTTGATGTCCACCTTGGTGC
20	CAGATCCTCCGCCAGATCCGCCTCCGCCCTTGATTCCAGCCGGTGC
21	GGGGCGGGTGTAGGCAGCCGGAGCTGGTGTGCTAGACACGGTCA ACCATTGTG
22	GGGGCGGGTGTAGGCAGCCGGAGCTGGTGTGCTAGACACGGTCA CGAGGGTG
23	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQQKPDQSPKLLIKYASQSFSG VPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCHQSSSLPYTFQGQGTKLEIK
24	GAGTCACAGGTGGCATTGGCGG
25	CGAACATCGCAGGTGGTCGACAGG
26	CACTCACCTTGCAGAACAGG
27	CCTTGTGCCGCTGAAATCCAAGG

(Continuación)

	<b>SEQ ID NO</b>	<b>Secuencia de aminoácidos o ADN</b>
5	<b>28</b>	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWFQQKPGKAPKSLIYAASSLQS GVPSRFSGSQSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQGTKLEIK
10	<b>29</b>	FGGTFSYYAI
	<b>30</b>	IIRFLGIANY
	<b>31</b>	CAGEPGERDPDAVDIW
	<b>32</b>	SGYSFSNYWI
	<b>33</b>	IIYPHDSDARY
15	<b>34</b>	CARHVGWGSRYWYFDL
	<b>35</b>	QSIGSSL
	<b>36</b>	LIKYASQSF
	<b>37</b>	HQSSSLPYTF
	<b>38</b>	QGISNYL
20	<b>39</b>	LIYAASSLQ
	<b>40</b>	QQYNSYPYTF
	<b>41</b>	MWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTAFLRVKFSRSA DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKDRRGRDPEMGGKPQRKNPQEGLYN ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
25	<b>42</b>	MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSILDPCSNCAGTFCDCNNRNQICSPCPNSFSSA GGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQG QELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPTNCSDLGKSVLVNGTKERDVVCGPSA DLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLFLTLRFSVVKRGRKKLL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPxEEEGGCEL
30	<b>43</b>	MLRLLLALNLFPSIQVTGNKILVKQSPMLVAYDNAVNLSCKYSYNLFSREFRASLHK GLDSAVEVCVVGNYSQQLQVYSKTGFNCDGKLGNEVTFLQNLVYVNTDIYFC KIEVMYPPPYLDNEKSNGLTIIHVKGKHLCPPLFPGPSKPFWVLVVGGVLACYSLL VTVAIFIWWRSKRSRLLHSYDMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS

## 35 LISTADO DE SECUENCIAS

&lt;110&gt; Onkimmune Limited

40 &lt;120&gt; CÉLULAS ASESINAS NATURALES MANIPULADAS Y USOS DE LAS MISMAS

&lt;130&gt; P40307WO

&lt;160&gt; 43

45 &lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 121

50 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

## ES 2 875 005 T3

5           Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
1                         5                                     10                             15

10           Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr  
20                         20                                     25                             30

15           Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35                         35                                     40                             45

20           Gly Arg Ile Ile Arg Phe Leu Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
50                         50                                     55                             60

25           Gln Gly Arg Val Thr Leu Ile Ala Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr  
65                         65                                     70                             75                             80

30           Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85                         85                                     90                             95

35           Ala Gly Glu Pro Gly Glu Arg Asp Pro Asp Ala Val Asp Ile Trp Gly  
100                         100                                     105                             110

40           Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115                         115                                     120

40           <210> 2  
40           <211> 107  
40           <212> PRT  
40           <213> Homo sapiens

40           <400> 2

45           Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1                         1                                     5                             10                             15

50           Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Ser Trp

55

60

65

## ES 2 875 005 T3

	20	25	30
5	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile		
	35	40	45
10	Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
	50	55	60
15	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
	65	70	75
20	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu		
	85	90	95
25	Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
	100	105	
	<210> 3		
	<211> 121		
30	<212> PRT		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 3		

## ES 2 875 005 T3

5           Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
1                         5                             10                             15

10           Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Pro Ser Gly Gly Thr Phe Arg Ser Tyr  
                       20                             25                             30

15           Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
                       35                             40                             45

20           Gly Arg Ile Ile Val Phe Leu Gly Lys Val Asn Tyr Ala Gln Arg Phe  
                       50                             55                             60

25           Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Thr Thr Ala Tyr  
                       65                             70                             75                             80

30           Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                       85                             90                             95

35           Thr Gly Glu Pro Gly Ala Arg Asp Pro Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly  
                       100                             105                             110

40           Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
                       115                             120

40           <210> 4  
40           <211> 107  
40           <212> PRT  
40           <213> Homo sapiens

40           <400> 4

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

5  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Ser Trp  
 20 25 30

10  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
 35 40 45

15  
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

20  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

25  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu  
 85 90 95

30  
 Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

35  
 <210> 5  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

40  
 <400> 5  
 40  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 1 5 10 15

45  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

50  
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

55  
 Gly Arg Ile Ile Arg Phe Leu Gly Lys Thr Asn His Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

60  
 Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

65  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

## ES 2 875 005 T3

5        <210> 6  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 10      <400> 6  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1                        5                        10                        15  
 15      Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Ser Trp  
 20                        25                        30  
 20      Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
 35                        40                        45  
 25      Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50                        55                        60  
 30      Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65                        70                        75                        80  
 35      Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu  
 85                        90                        95  
 40      Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100                       105  
 45      <210> 7  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 50      <400> 7  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 1                        5                        10                        15  
 55      Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Asn Tyr  
 20                        25                        30  
 60      Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35                        40                        45

	Gly Ile Ile Tyr Pro His Asp Ser Asp Ala Arg Tyr Ser Pro Ser Phe			
	50	55	60	
5				
	Gln Gly Gln Val Thr Phe Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr			
	65	70	75	80
10				
	Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys			
	85	90	95	
15				
	Ala Arg His Val Gly Trp Gly Ser Arg Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp			
	100	105	110	
20				
	Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
	115	120		
25	<210> 8			
	<211> 45			
	<212> ADN			
	<213> Homo sapiens			
30	<400> 8			
	ctgctgctgc atgcggcgcg cccggacatc cagatgaccc agagc	45		
	<210> 9			
	<211> 45			
	<212> ADN			
35	<213> Homo sapiens			
	<400> 9			
	ctgctgctgc atgcggcgcg cccggacatc cagctgaccc agagc	45		
40	<210> 10			
	<211> 45			
	<212> ADN			
	<213> Homo sapiens			
45	<400> 10			
	ctgctgctgc atgcggcgcg cccggccatc cagctgaccc agagc	45		
	<210> 11			
	<211> 45			
50	<212> ADN			
	<213> Homo sapiens			
	<400> 11			
	ctgctgctgc atgcggcgcg cccgggtgatc tggatgaccc agagc	45		
55	<210> 12			
	<211> 45			
	<212> ADN			
	<213> Homo sapiens			
60	<400> 12			
	ctgctgctgc atgcggcgcg cccggagatc gtgctgaccc agagc	45		
	<210> 13			
65	<211> 45			
	<212> ADN			
	<213> Homo sapiens			

## ES 2 875 005 T3

5           <400> 13  
 ctgctgctgc atgcggcgcg cccggagatc gtgatgaccc agagc       45  
 <210> 14  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 10          <400> 14  
 ctgctgctgc atgcggcgcg cccggacatc gtgatgaccc agagc       45  
 <210> 15  
 15          <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 15  
 20          gccccggagg atctggggga ggcggctctc aggtgcagct ggtgcagagc g       51  
 <210> 16  
 <211> 52  
 <212> ADN  
 25          <213> Homo sapiens  
 <400> 16  
 gccccggagg atctggggga ggcggctctg aagtgcagct ggtgcagtc gg       52  
 30          <210> 17  
 <211> 52  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 35          <400> 17  
 cagatcctcc gcccggagat ccgcctccgc ccttgatctc caccttggtg cc       52  
 <210> 18  
 <211> 52  
 40          <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 18  
 cagatcctcc gcccggagat ccgcctccgc ccttgatttc cagcttggtg cc       52  
 45          <210> 19  
 <211> 52  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 50          <400> 19  
 cagatcctcc gcccggagat ccgcctccgc ccttgatgtc caccttggtg cc       52  
 <210> 20  
 55          <211> 52  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 20  
 60          cagatcctcc gcccggagat ccgcctccgc ccttgatttc cagccgggtg cc       52  
 <210> 21  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 65          <213> Homo sapiens  
 <400> 21

## ES 2 875 005 T3

5 gggcgccgtg taggcggccg cgagctgggt gtgttgtgc tggacacggc gaccattgtg 60  
 <210> 22  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

10 gggcgccgtg taggcggccg cgagctgggt gtgttgtgc tagacacggc cacgagggtg 60  
 <210> 22  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 15 <213> Homo sapiens  
 <400> 23

20	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Phe	Gln	Ser	Val	Thr	Pro	Lys
	1				5					10					15	

25 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser 30  
 <400> 23

30	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
					35					40				45		

35 Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly 60  
 <400> 23

40	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Asn	Ser	Leu	Glu	Ala
	65				70					75				80		

45 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Tyr 95  
 <400> 23

50	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys				
						100				105					

55 <210> 24  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 24

60 gagtcacagg tggcattgg egg 23  
 <210> 25  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 25

65 cgaatcgcag gtggtcgcac agg 23  
 <210> 26  
 <211> 23

## ES 2 875 005 T3

<212> ADN  
 <213> Homo sapiens

5    <400> 26  
 cactcacctt tgcagaagac agg        23

<210> 27  
 <211> 23

10   <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 27  
 ctttgtgccg ctgaaatcca agg        23

15   <210> 28  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

20   <400> 28

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5						10				15	

25

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Asn	Tyr
				20					25				30		

30

Leu	Ala	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Ser	Leu	Ile
				35			40					45			

35

Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
				50			55			60					

40

Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70				75				80		

45

Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn	Ser	Tyr	Pro	Tyr
					85				90				95		

50

Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys					
					100			105							

55   <210> 29  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 29

60

Phe	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Ala	Ile						
1				5					10						

65   <210> 30  
 <211> 10  
 <212> PRT

## ES 2 875 005 T3

<213> Homo sapiens  
 <400> 30  
 5                   **Ile Ile Arg Phe Leu Gly Ile Ala Asn Tyr**  
 1                   5                                   10  
 10    <210> 31  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 15    <400> 31  
 10                   **Cys Ala Gly Glu Pro Gly Glu Arg Asp Pro Asp Ala Val Asp Ile Trp**  
 1                   5                                   10                                   15  
 20    <210> 32  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 25    <400> 32  
 10                   **Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Asn Tyr Trp Ile**  
 30                   1                                   5                                   10  
 35    <210> 33  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 40    <400> 33  
 10                   **Ile Ile Tyr Pro His Asp Ser Asp Ala Arg Tyr**  
 45                   1                                   5                                   10  
 45    <210> 34  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 50    <400> 34  
 10                   **Cys Ala Arg His Val Gly Trp Gly Ser Arg Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu**  
 55                   1                                   5                                   10                                   15  
 55    <210> 35  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 60    <400> 35  
 10                   **Gln Ser Ile Gly Ser Ser Leu**  
 65                   1                                   5  
 65    <210> 36  
 <211> 9  
 <212> PRT

<213> Homo sapiens  
 <400> 36  
 5                   **Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe**  
 1                       5  
 10    <210> 37  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 15    <400> 37  
 20                   **His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Tyr Thr Phe**  
 1                       5                           10  
 25    <210> 38  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 30    <400> 38  
 35                   **Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu**  
 1                       5  
 <210> 39  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 40    <400> 39  
 45                   **Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln**  
 1                       5  
 <210> 40  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 50    <400> 40  
 55                   **Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe**  
 1                       5                           10  
 <210> 41  
 <211> 164  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 41

## ES 2 875 005 T3

	Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu			
1	5	10	15	
5				
	Pro Ile Thr Glu Ala Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys			
	20	25	30	
10				
	Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala			
	35	40	45	
15				
	Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr			
	50	55	60	
20				
	Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg			
	65	70	75	80
25				
	Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met			
	85	90	95	
30				
	Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn			
	100	105	110	
35				
	Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met			
	115	120	125	
40				
	Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly			
	130	135	140	
45				
	Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala			
	145	150	155	160
	<b>Leu Pro Pro Arg</b>			
50				
	<210> 42			
	<211> 255			
	<212> PRT			
	<213> Homo sapiens			
55				
	<400> 42			

## ES 2 875 005 T3

	Met	Gly	Asn	Ser	Cys	Tyr	Asn	Ile	Val	Ala	Thr	Leu	Leu	Leu	Val	Leu
1					5					10						15
5																
	Asn	Phe	Glu	Arg	Thr	Arg	Ser	Leu	Gln	Asp	Pro	Cys	Ser	Asn	Cys	Pro
					20					25						30
10																
	Ala	Gly	Thr	Phe	Cys	Asp	Asn	Asn	Arg	Asn	Gln	Ile	Cys	Ser	Pro	Cys
					35				40							45
15																
	Pro	Pro	Asn	Ser	Phe	Ser	Ser	Ala	Gly	Gly	Gln	Arg	Thr	Cys	Asp	Ile
					50				55							60
20																
	Cys	Arg	Gln	Cys	Lys	Gly	Val	Phe	Arg	Thr	Arg	Lys	Glu	Cys	Ser	Ser
					65			70				75				80
25																
	Thr	Ser	Asn	Ala	Glu	Cys	Asp	Cys	Thr	Pro	Gly	Phe	His	Cys	Leu	Gly
					85				90							95
30																
	Ala	Gly	Cys	Ser	Met	Cys	Glu	Gln	Asp	Cys	Lys	Gln	Gly	Gln	Glu	Leu
					100				105							110
35																
	Thr	Lys	Lys	Gly	Cys	Lys	Asp	Cys	Cys	Phe	Gly	Thr	Phe	Asn	Asp	Gln
					115				120							125
40																
	Lys	Arg	Gly	Ile	Cys	Arg	Pro	Trp	Thr	Asn	Cys	Ser	Leu	Asp	Gly	Lys
					130			135								140
45																
	Ser	Val	Leu	Val	Asn	Gly	Thr	Lys	Glu	Arg	Asp	Val	Val	Cys	Gly	Pro
					145			150				155				160
50																
	Ser	Pro	Ala	Asp	Leu	Ser	Pro	Gly	Ala	Ser	Ser	Val	Thr	Pro	Pro	Ala
					165				170							175
55																
	Pro	Ala	Arg	Glu	Pro	Gly	His	Ser	Pro	Gln	Ile	Ile	Ser	Phe	Phe	Leu
					180				185							190
60																
	Ala	Leu	Thr	Ser	Thr	Ala	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Phe	Phe	Leu	Thr	Leu
								195		200						205
65																

## ES 2 875 005 T3

Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe  
 210 215 220

5

Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly  
 225 230 235 240

10

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu  
 245 250 255

15 <210> 43  
 <211> 220  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

20 <400> 43

Met Leu Arg Leu Leu Leu Ala Leu Asn Leu Phe Pro Ser Ile Gln Val  
 1 5 10 15

25

Thr Gly Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Met Leu Val Ala Tyr  
 20 25 30

30

Asp Asn Ala Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Ser Tyr Asn Leu Phe Ser  
 35 40 45

35

Arg Glu Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly Leu Asp Ser Ala Val Glu  
 50 55 60

40

Val Cys Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser  
 65 70 75 80

45

Lys Thr Gly Phe Asn Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Ser Val Thr  
 85 90 95

50

Phe Tyr Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe Cys  
 100 105 110

55

Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser  
 115 120 125

60

Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro  
 130 135 140

65

Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly  
 145 150 155 160

Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile  
 165 170 175

ES 2 875 005 T3

Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met  
180 185 190

5

Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro  
195 200 205

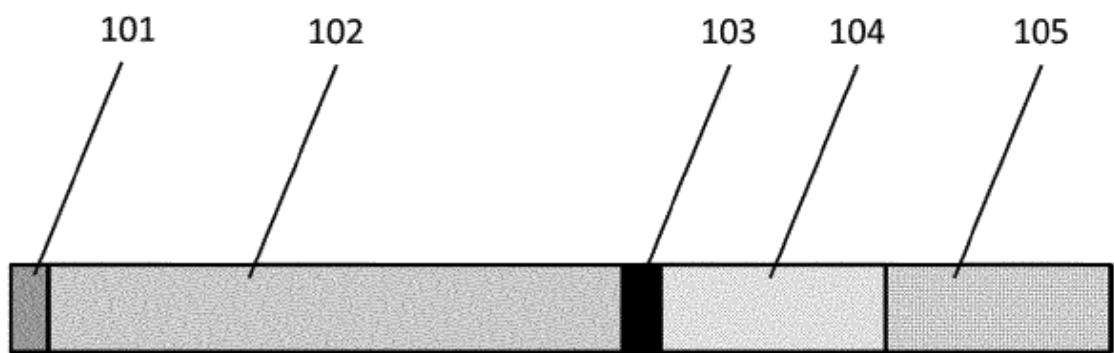
10

Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser  
210 215 220

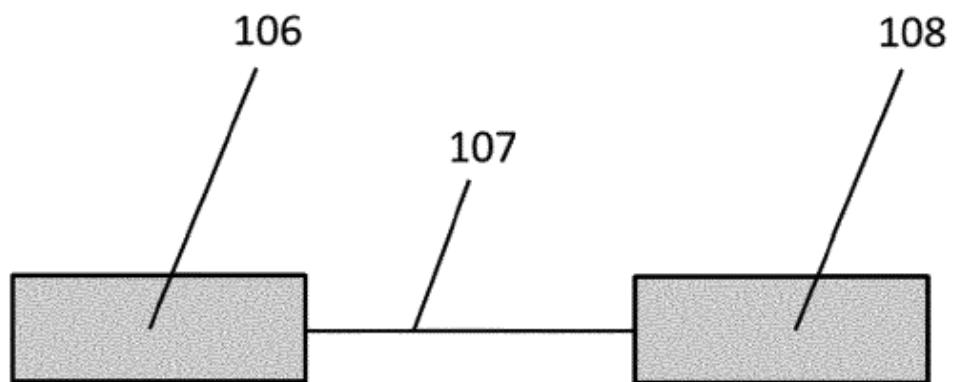
15

**REIVINDICACIONES**

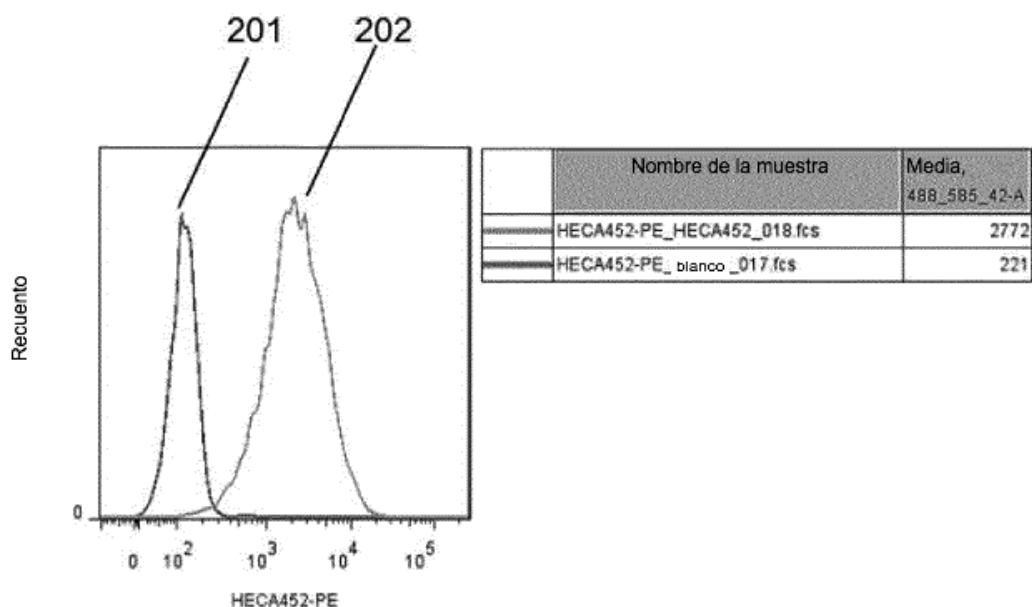
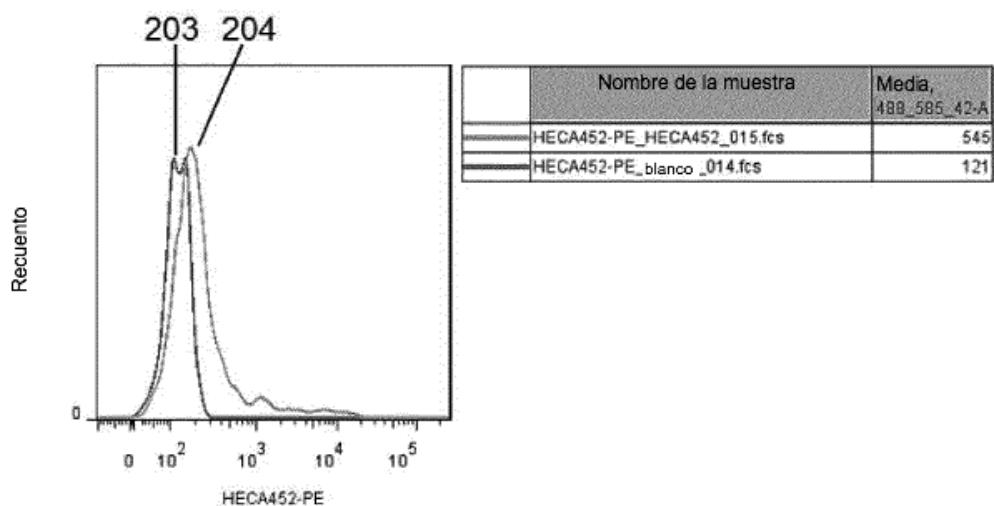
- 5        1. Una célula asesina natural (NK) que expresa un receptor de antígeno quimérico (CAR) para CD38, en la que el CAR tiene afinidad para CD38 que es al menos un 25% menor que la afinidad de Daratumumab por CD38.
- 10      2. Una célula NK según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la célula NK es una célula KHYG-1 o un derivado de la misma.
- 15      3. Una célula NK según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la célula NK tiene una afinidad disminuida por las células normales (no malignas) que expresan CD38, en comparación con su afinidad por las células cancerosas que expresan CD38.
- 20      4. Una célula NK según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el CAR CD38 comprende una región variable de cadena pesada que tiene una homología de secuencia de al menos 50% con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 7.
- 25      5. Una célula NK según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el CAR CD38 comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 7.
- 30      6. Una célula NK según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el CAR CD38 comprende una o más o todas las cadenas pesadas CDR en SEQ ID NO:s 29, 30 y 31.
- 35      7. Una célula NK según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el CAR CD38 comprende una o más o todas las cadenas pesadas CDR en SEQ ID NO:s 32, 33 y 34.
- 40      8. Una célula NK según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el CAR CD38 comprende una región variable de cadena ligera que tiene una homología de secuencia de al menos 50% con SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 28.
- 45      9. Una célula NK según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el CAR CD38 comprende una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 28.
- 50      10. Una célula NK según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el CAR CD38 comprende una o más o todas las cadenas ligeras CDR en SEQ ID NO:s 35, 36 y 37.
- 55      11. Una célula NK según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el CAR CD38 comprende una o más o todas las cadenas ligeras CDR en SEQ ID NO:s 38, 39 y 40.
- 60      12. Una célula NK según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el CAR CD38 comprende uno o más dominios coestimuladores seleccionados de SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 43.
- 65      13. Una célula NK según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la célula NK se ha modificado adicionalmente para expresar un TRAIL variante que ha aumentado la afinidad por los receptores de muerte TRAIL, en relación con TRAIL de tipo salvaje.
- 70      14. Una célula NK según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la célula NK se ha modificado adicionalmente para eliminar o golpear hacia abajo la expresión de un receptor inhibidor de punto de control.
- 75      15. Una célula NK según la reivindicación 14, en la que el receptor inhibidor del punto de control se selecciona entre uno o más o todos los CD96 (TACTILE), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG-3), CD279 (PD-1), CD328 (SIGLEC7), SIGLEC9, TIGIT y TIM-3.



**Figura 1A**



**FIGURA 1B**

**FIGURA 2A****FIGURA 2B**

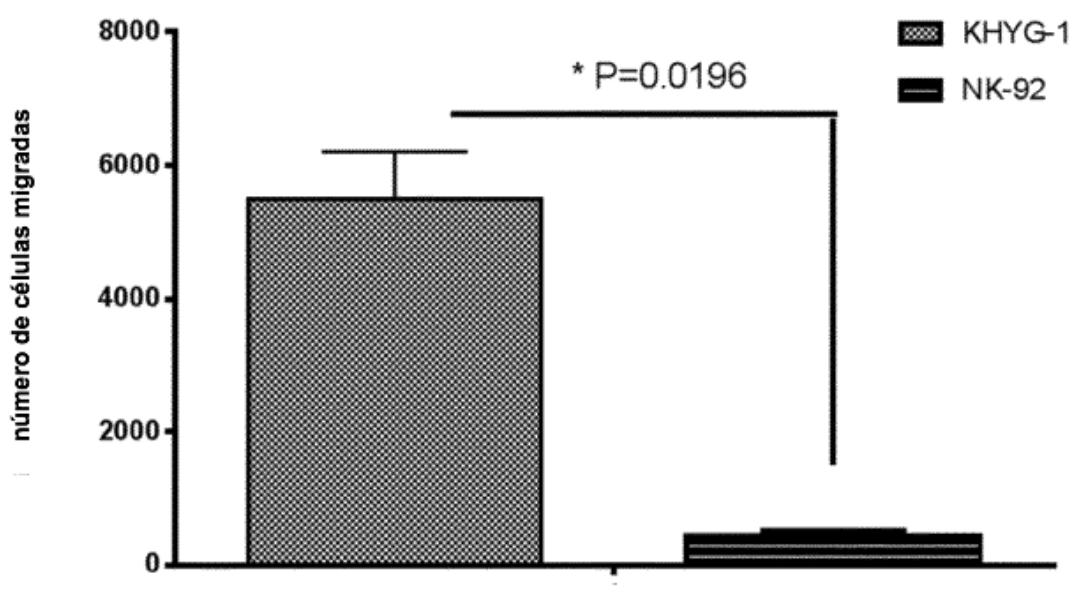


FIGURA 3

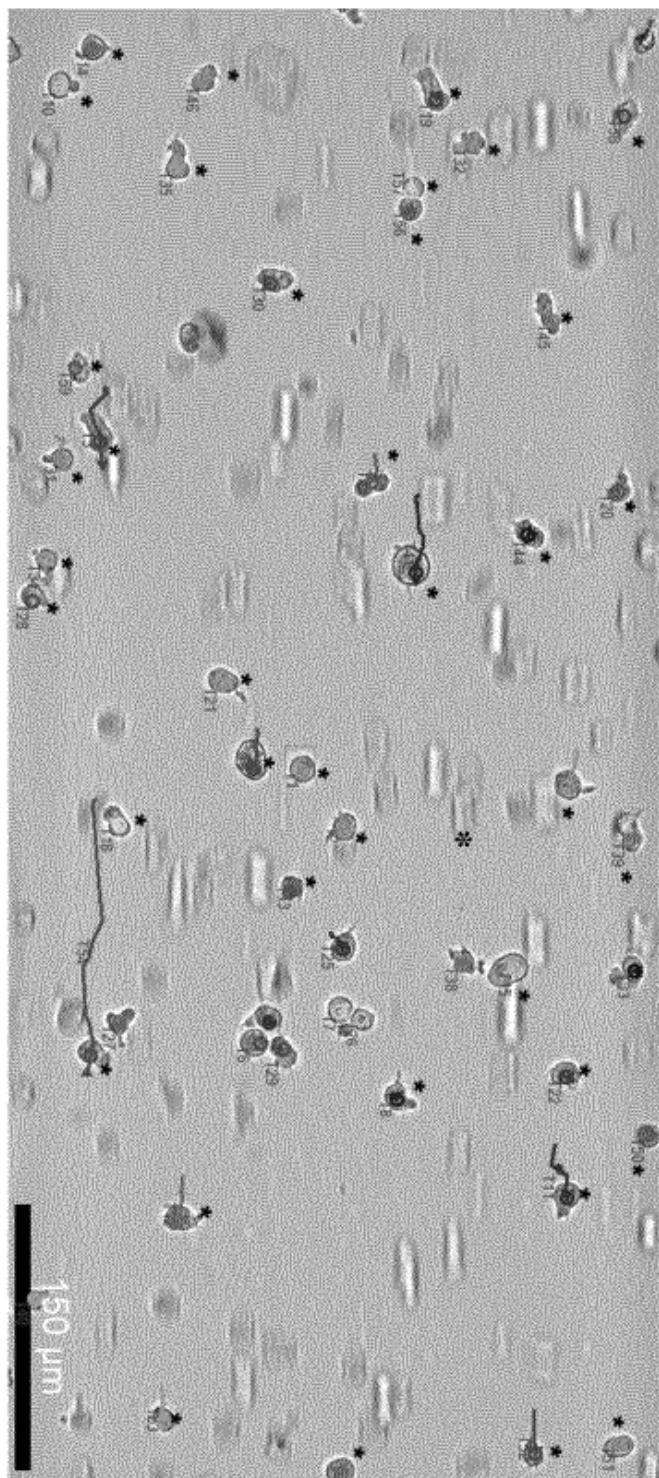


FIGURA 4A

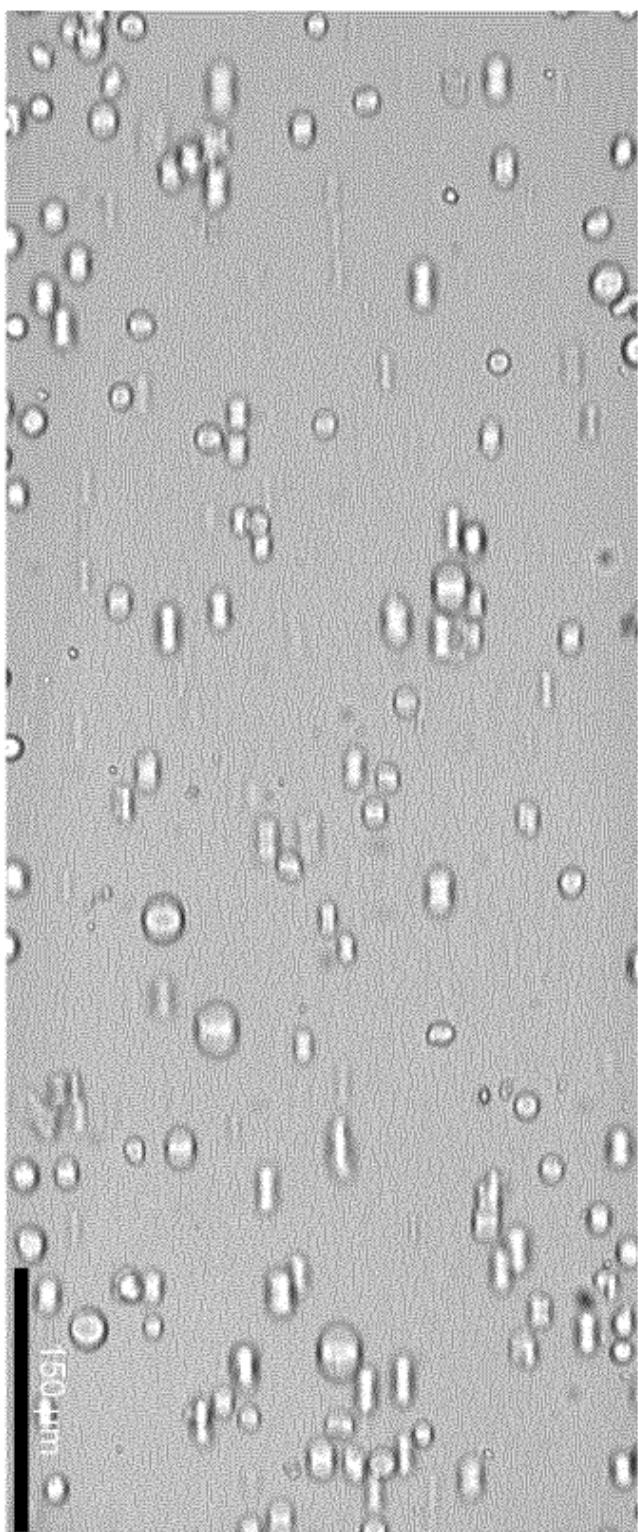
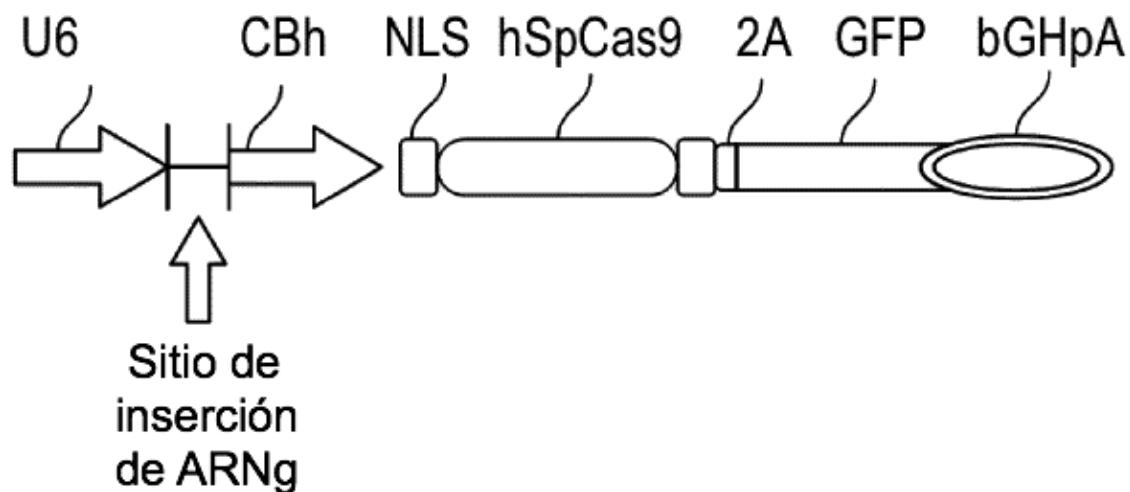


FIGURA 4B

ARNg quimérico + vector de coexpresión de hSpCas9



**FIGURA 5**

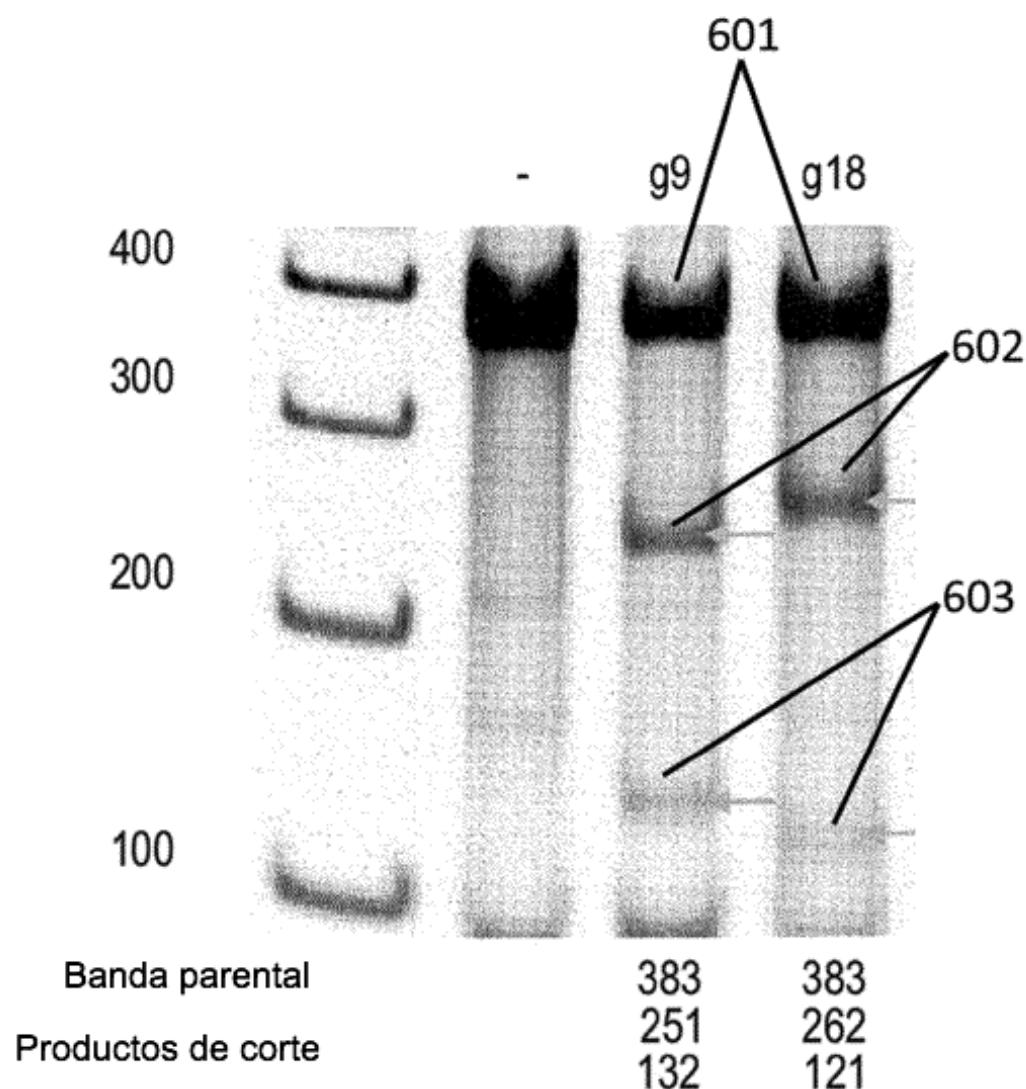


FIGURA 6

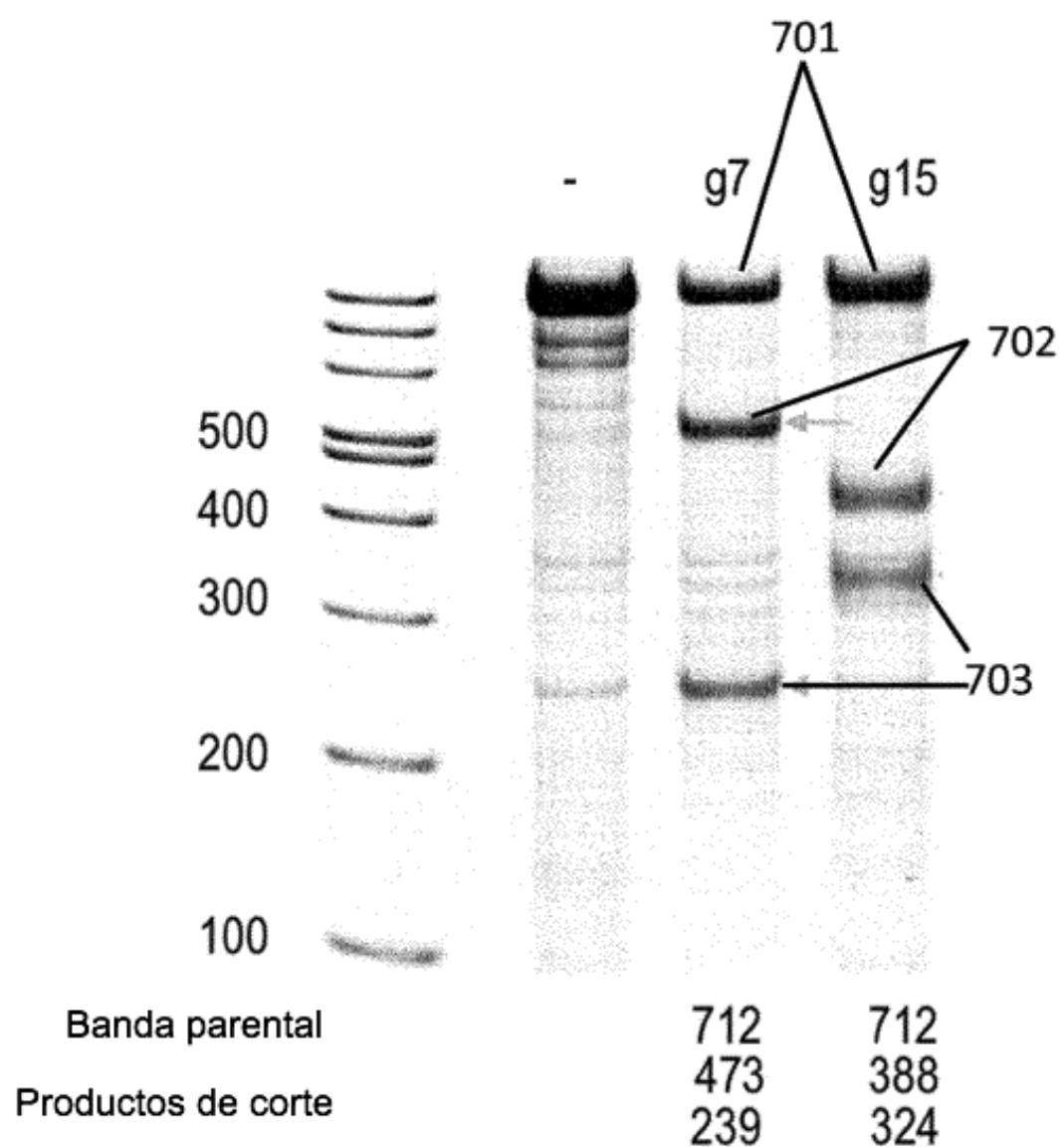
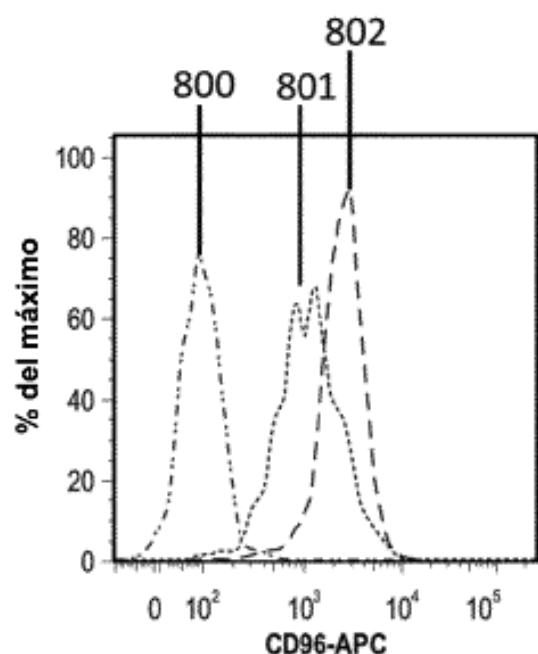
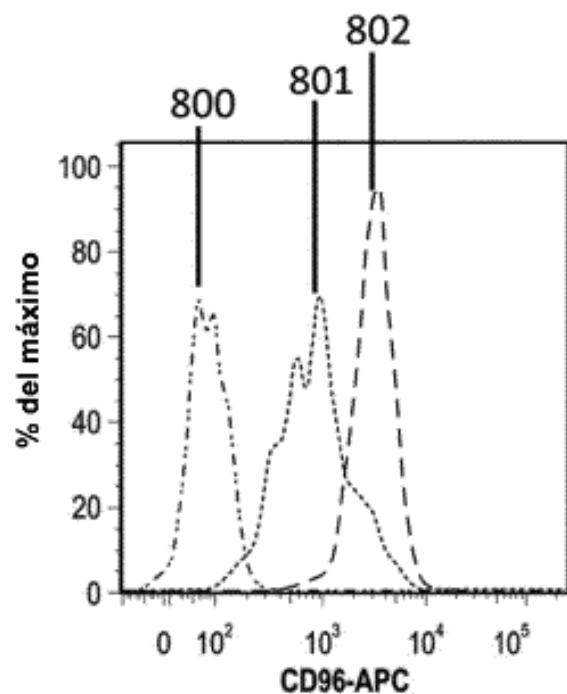


FIGURA 7



**FIGURA 8A**



**FIGURA 8B**

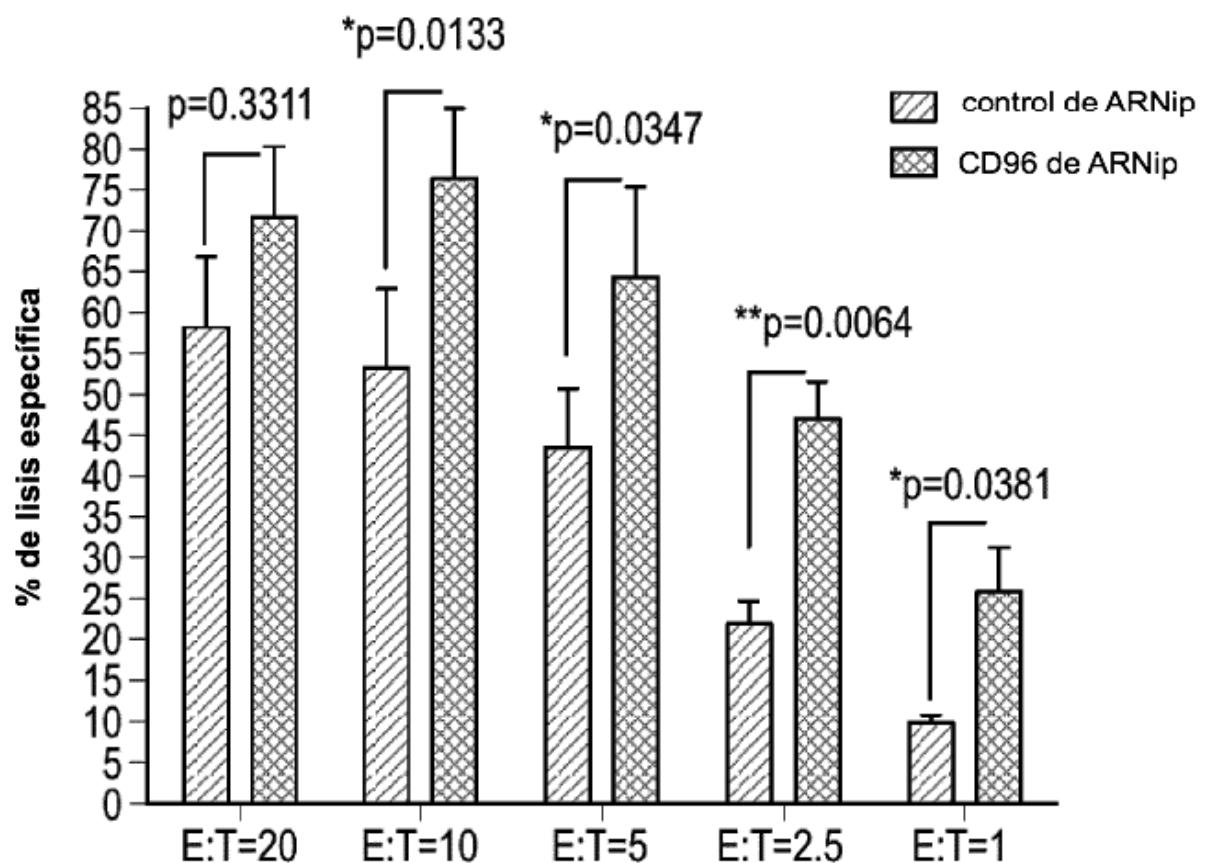


FIGURA 9

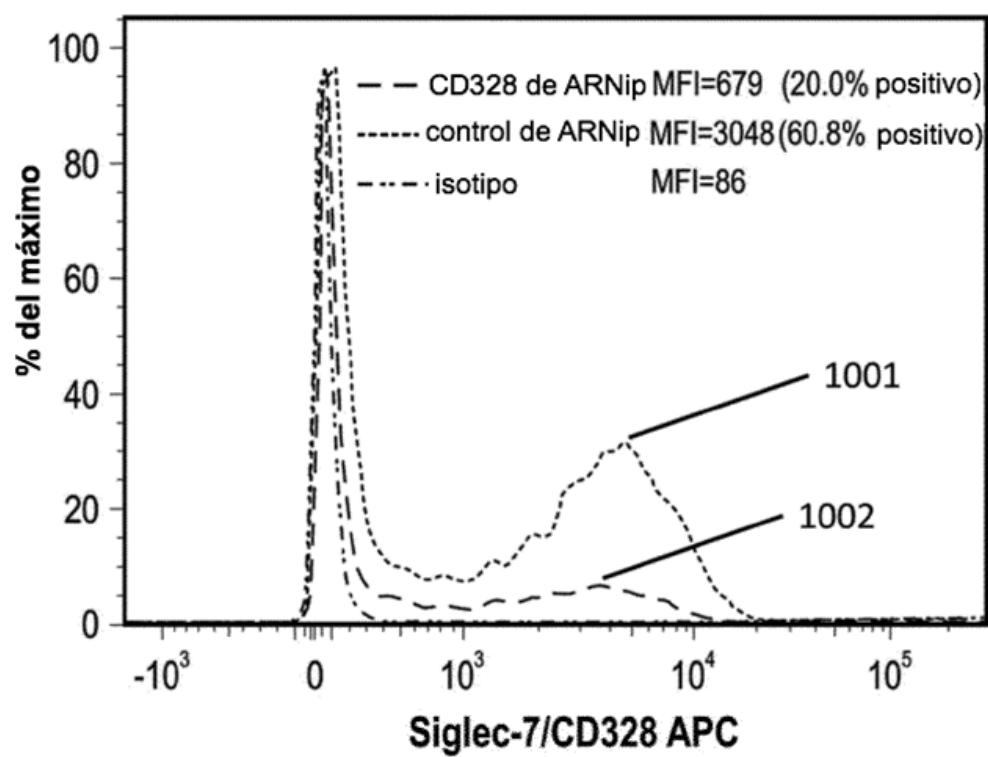
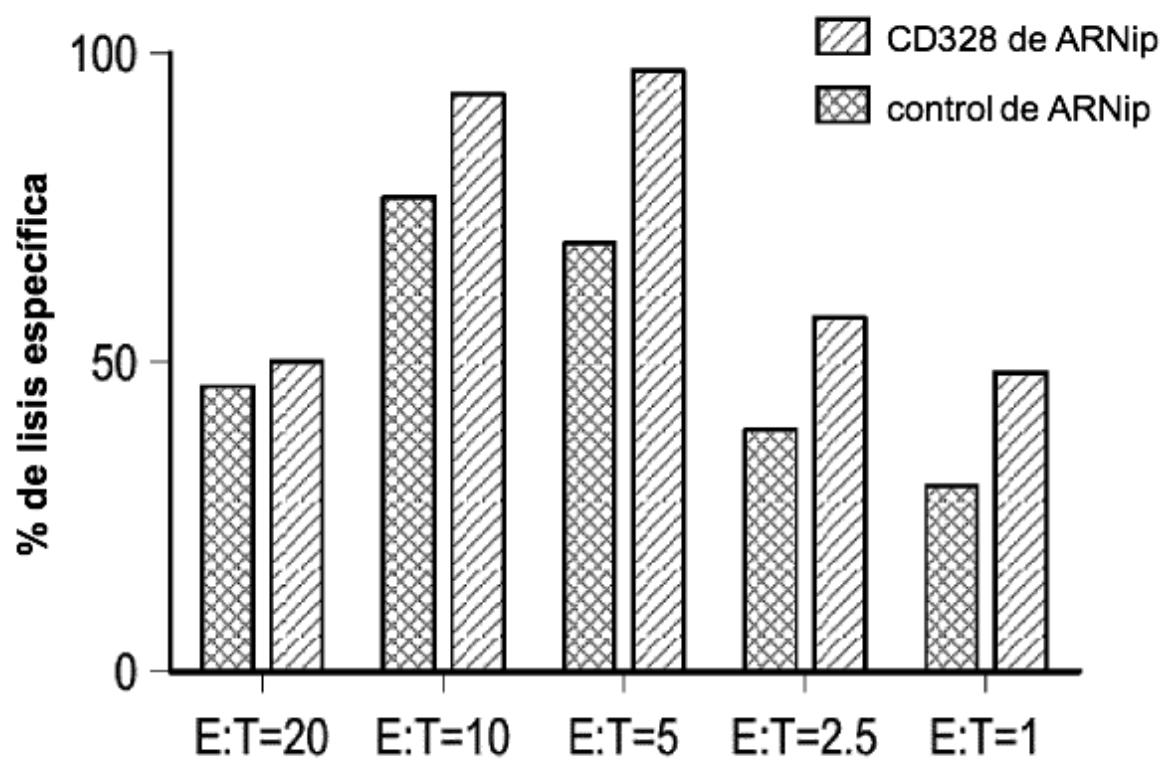


FIGURA 10



**FIGURA 11**

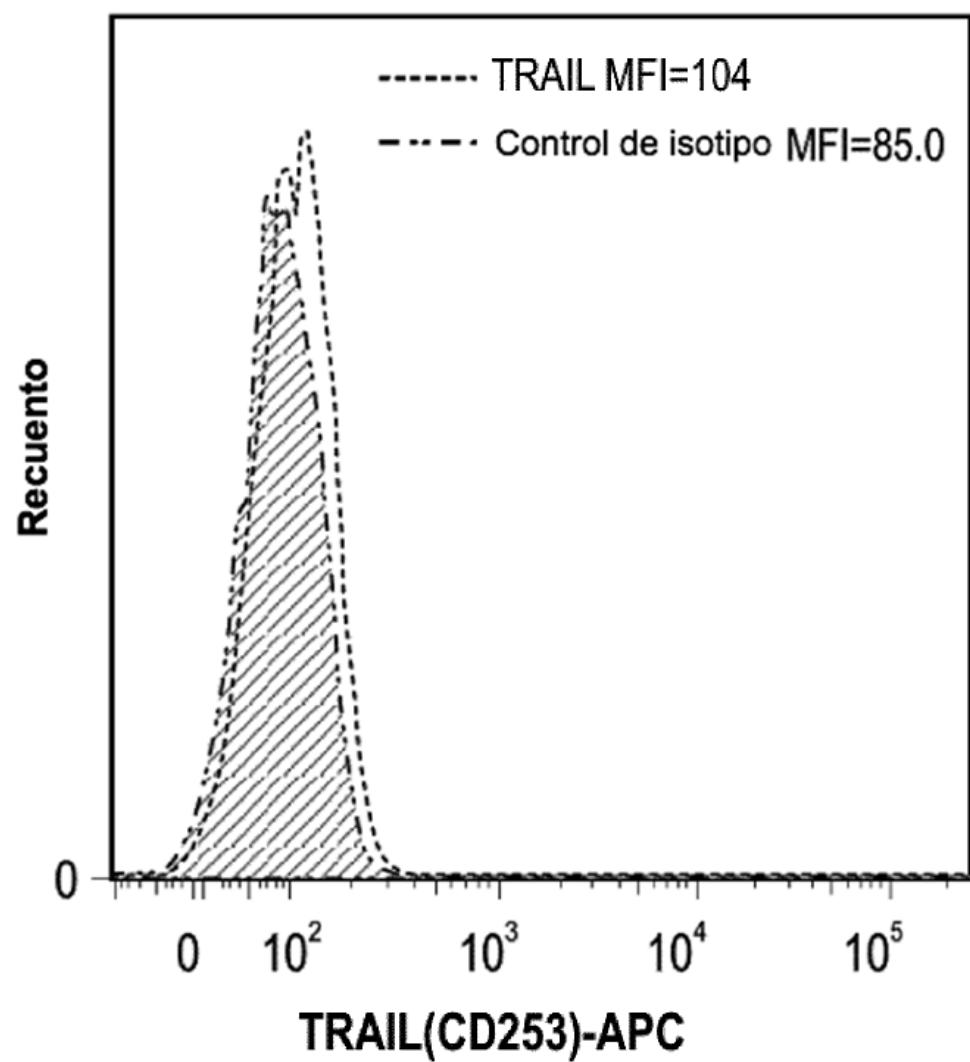


FIGURA 12

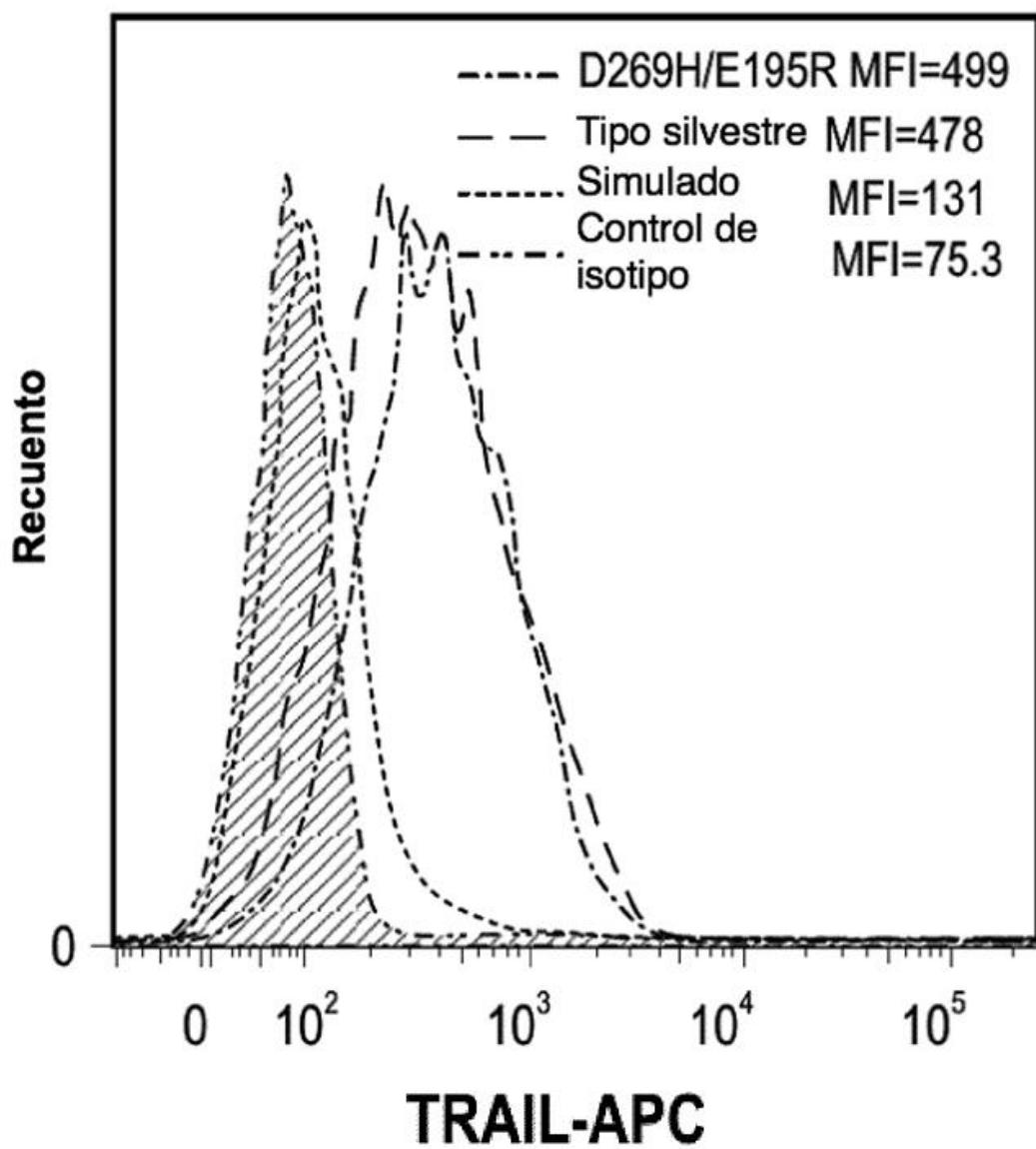


FIGURA 13

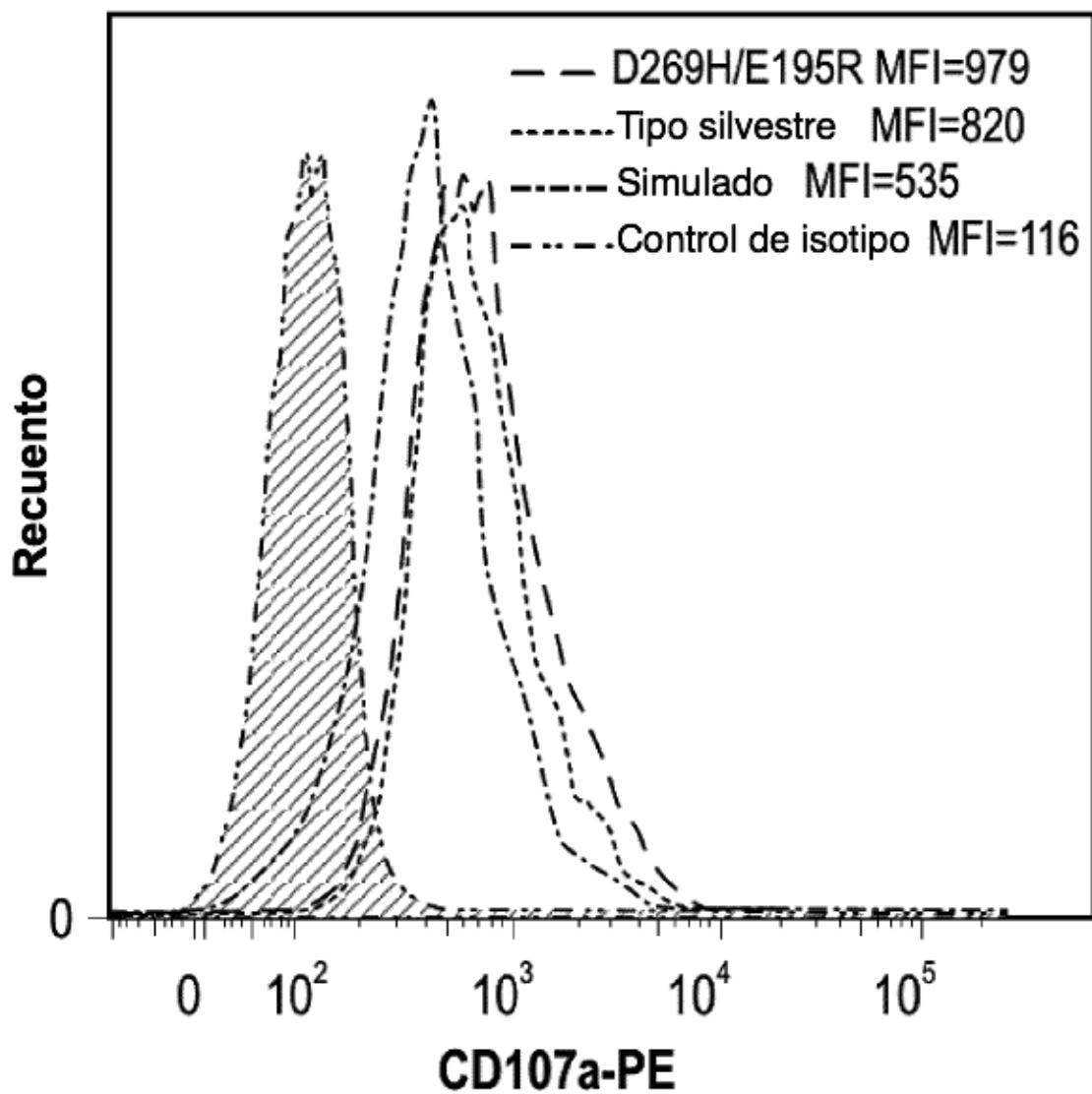


FIGURA 14

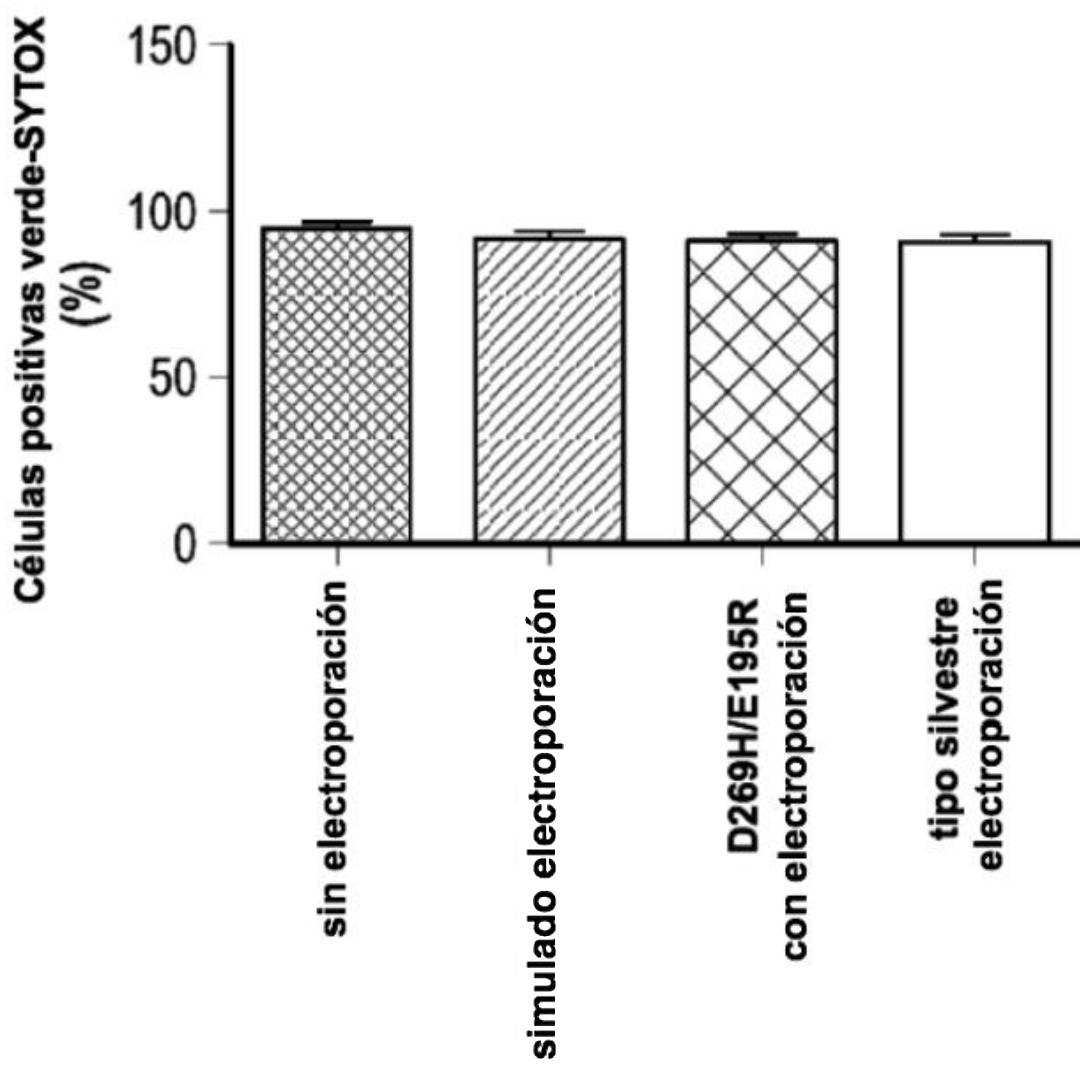


FIGURA 15

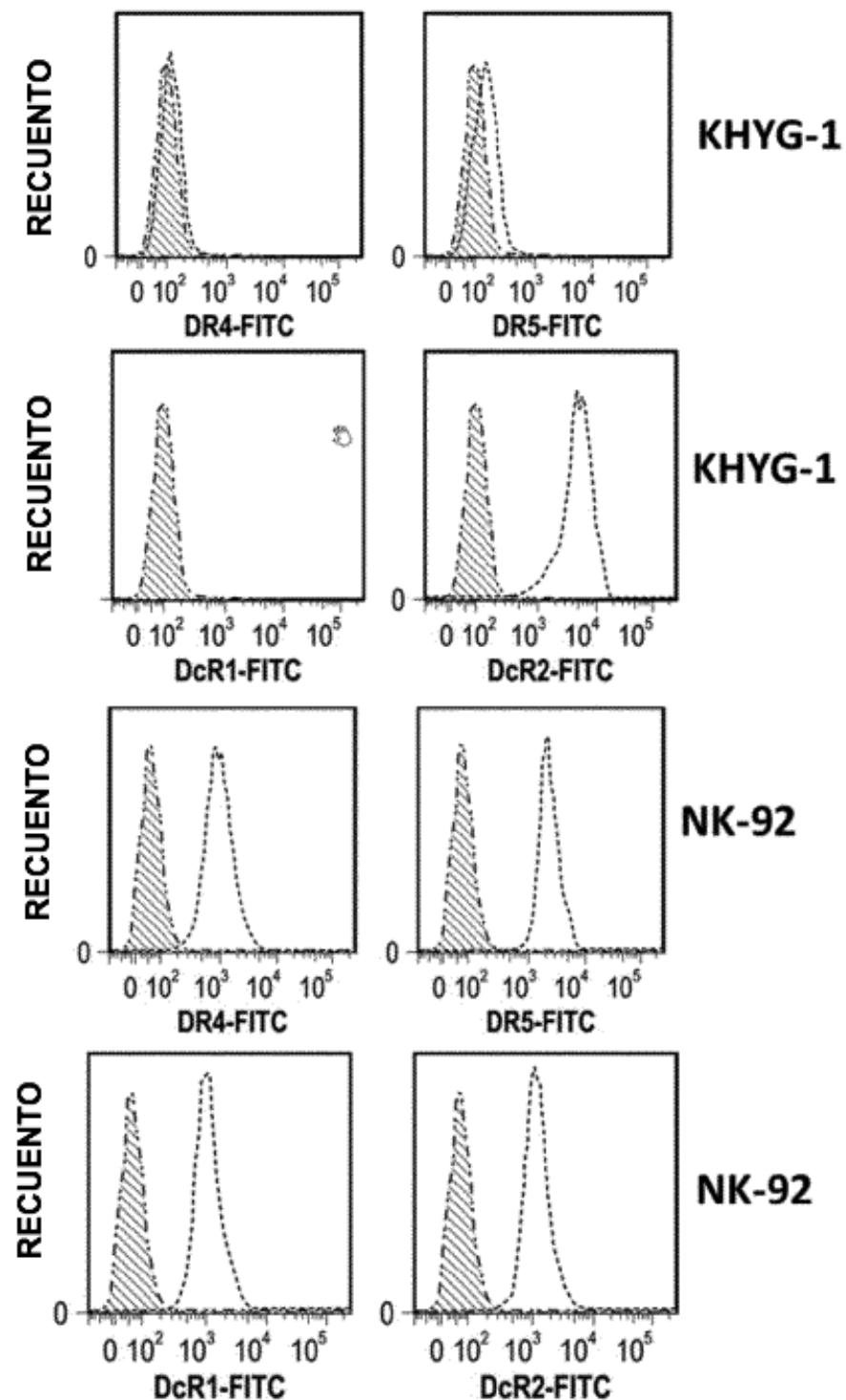


FIGURA 16

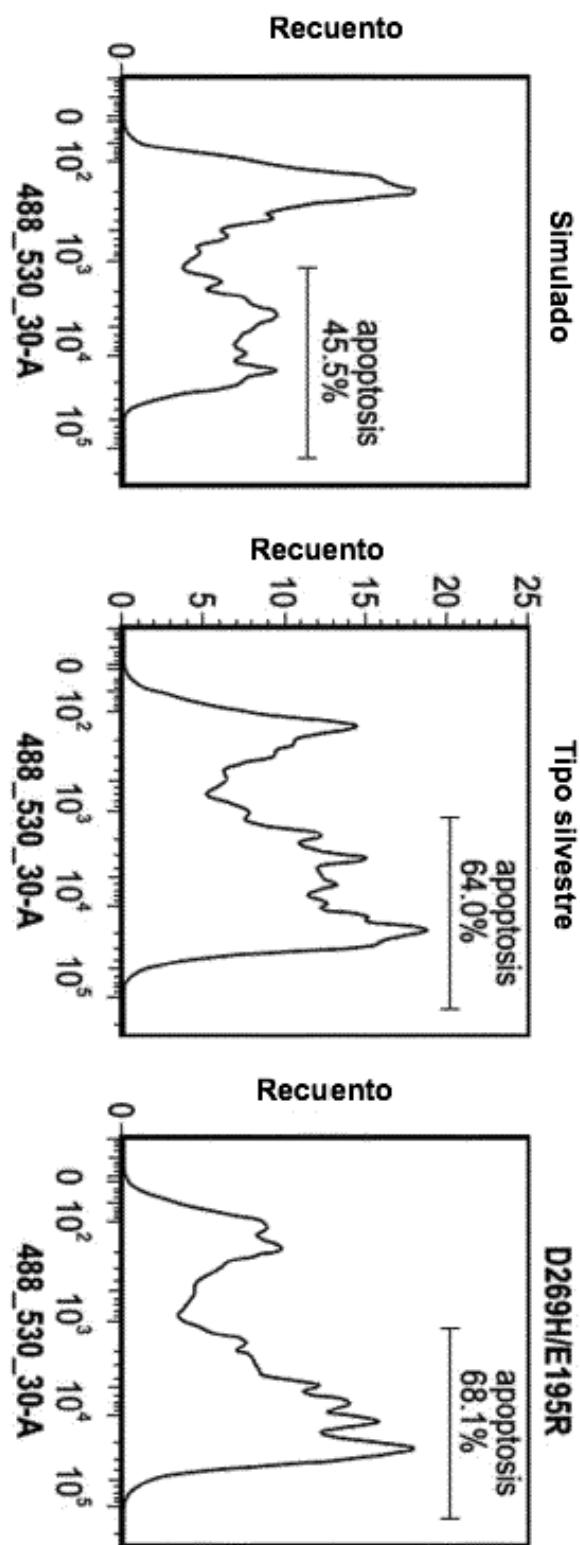
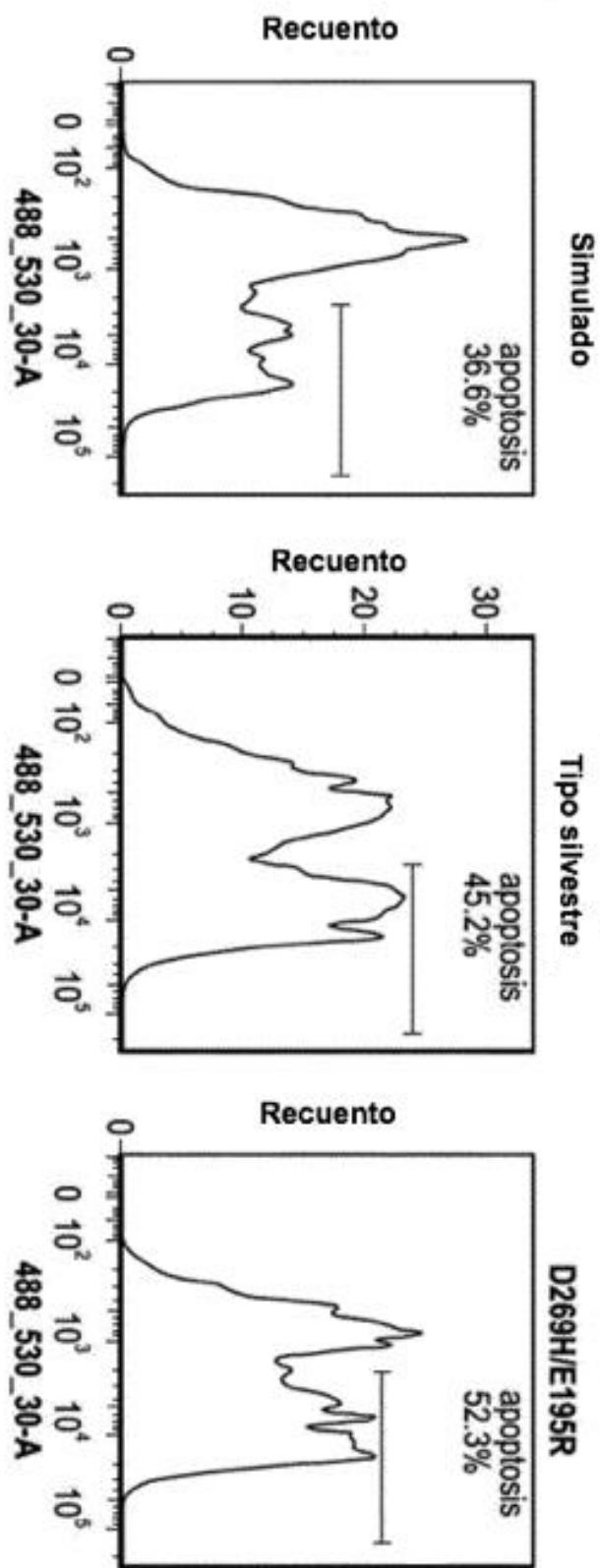


FIGURA 17

FIGURA 18



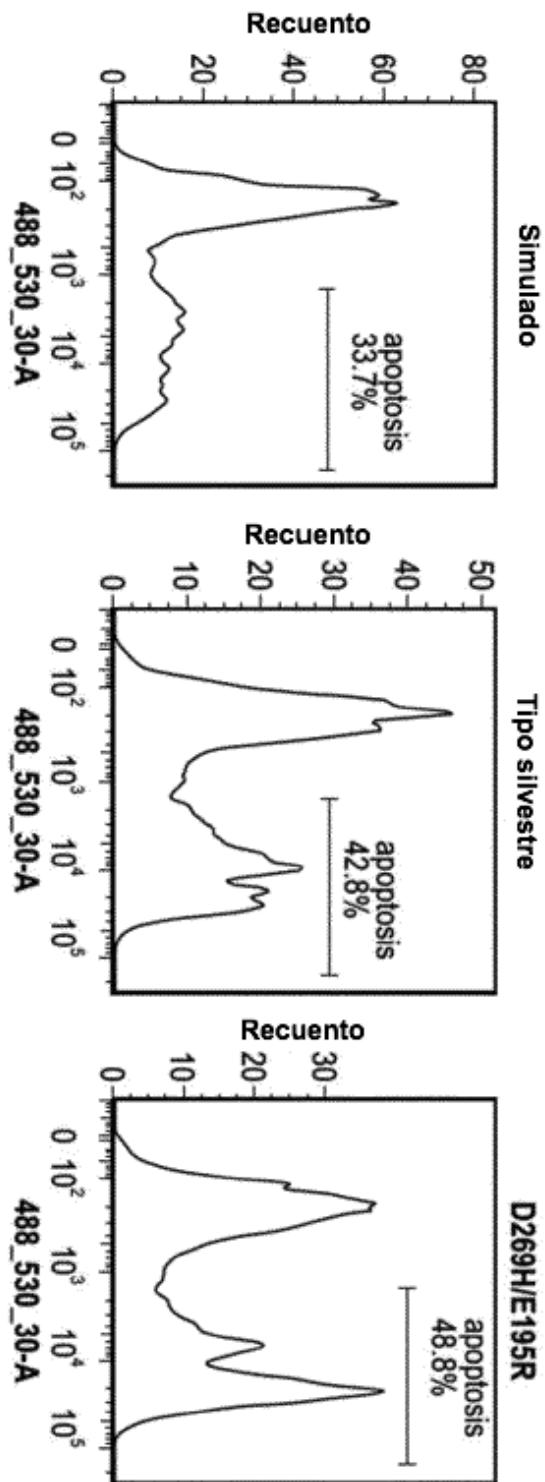
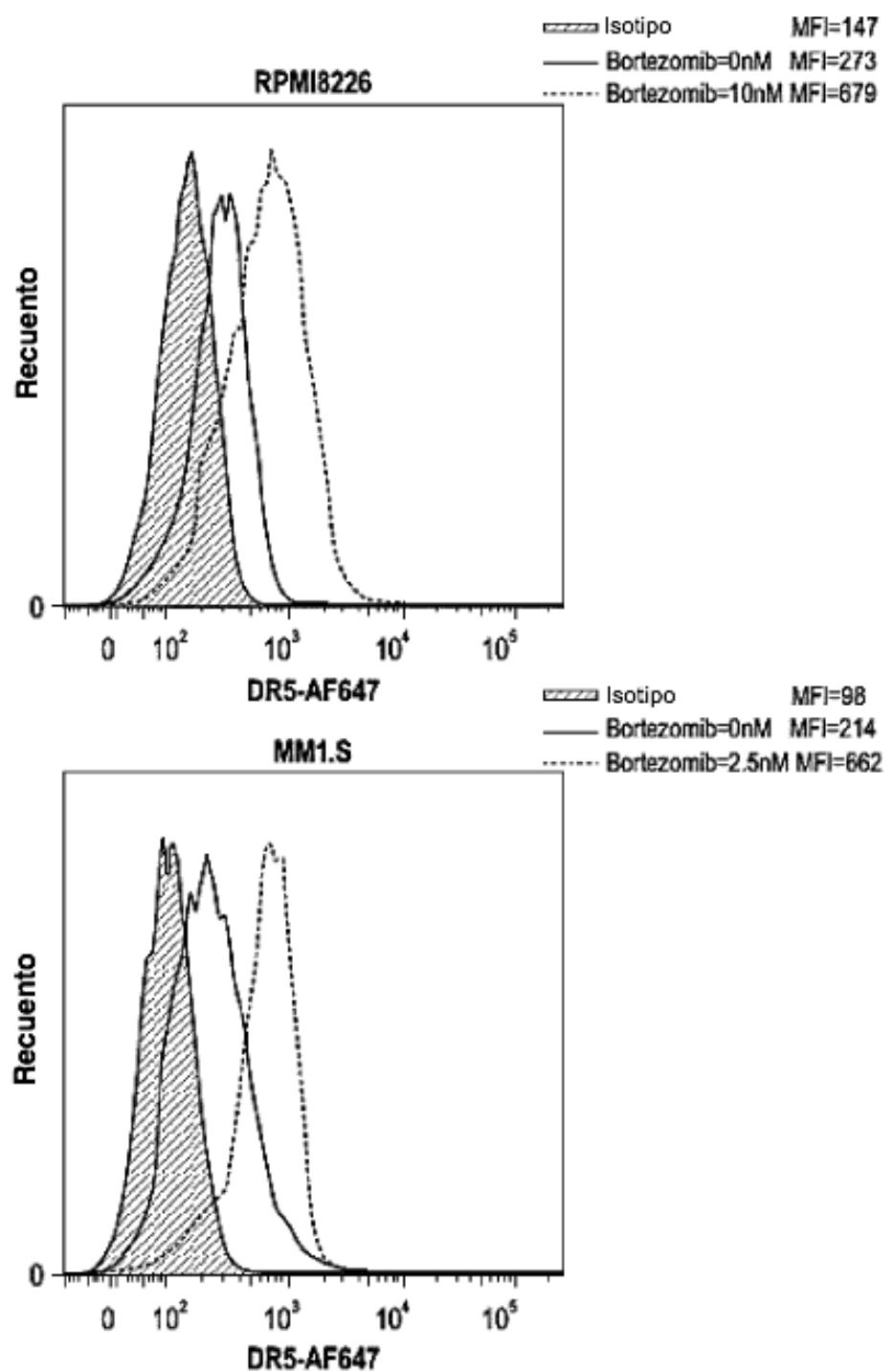
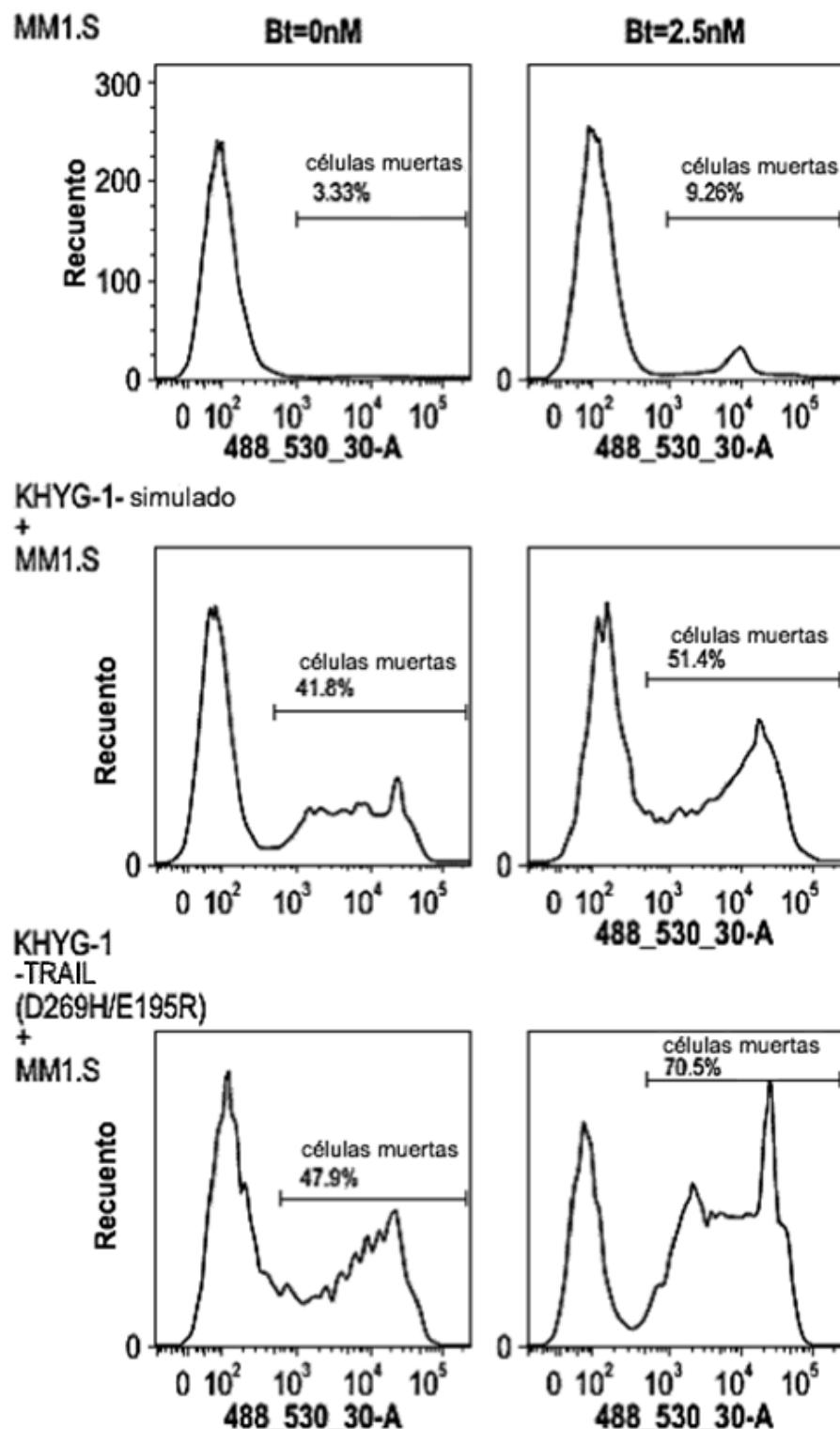
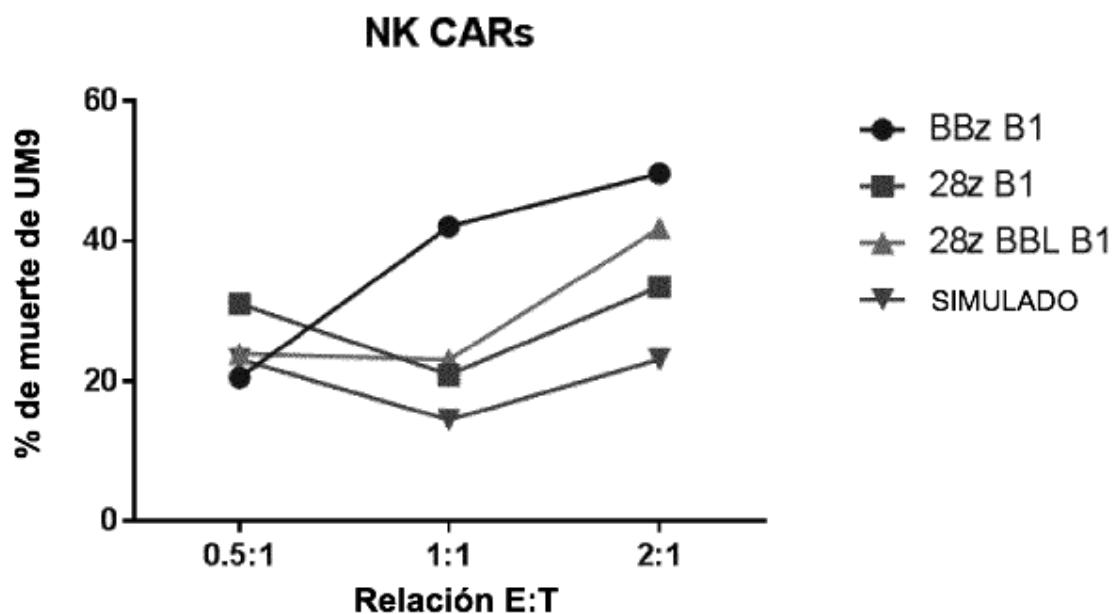


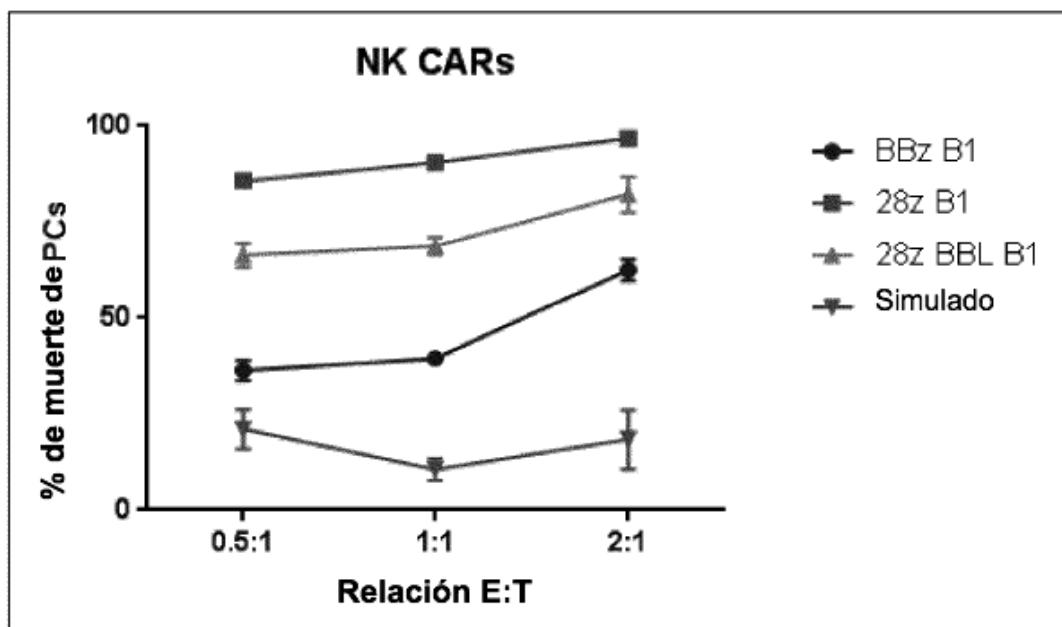
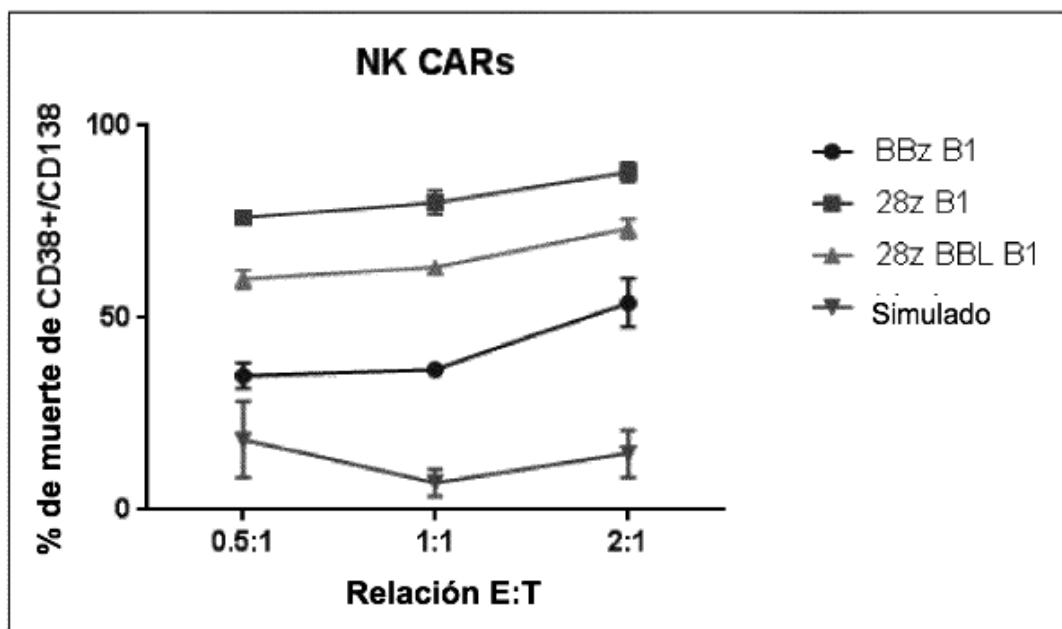
FIGURA 19

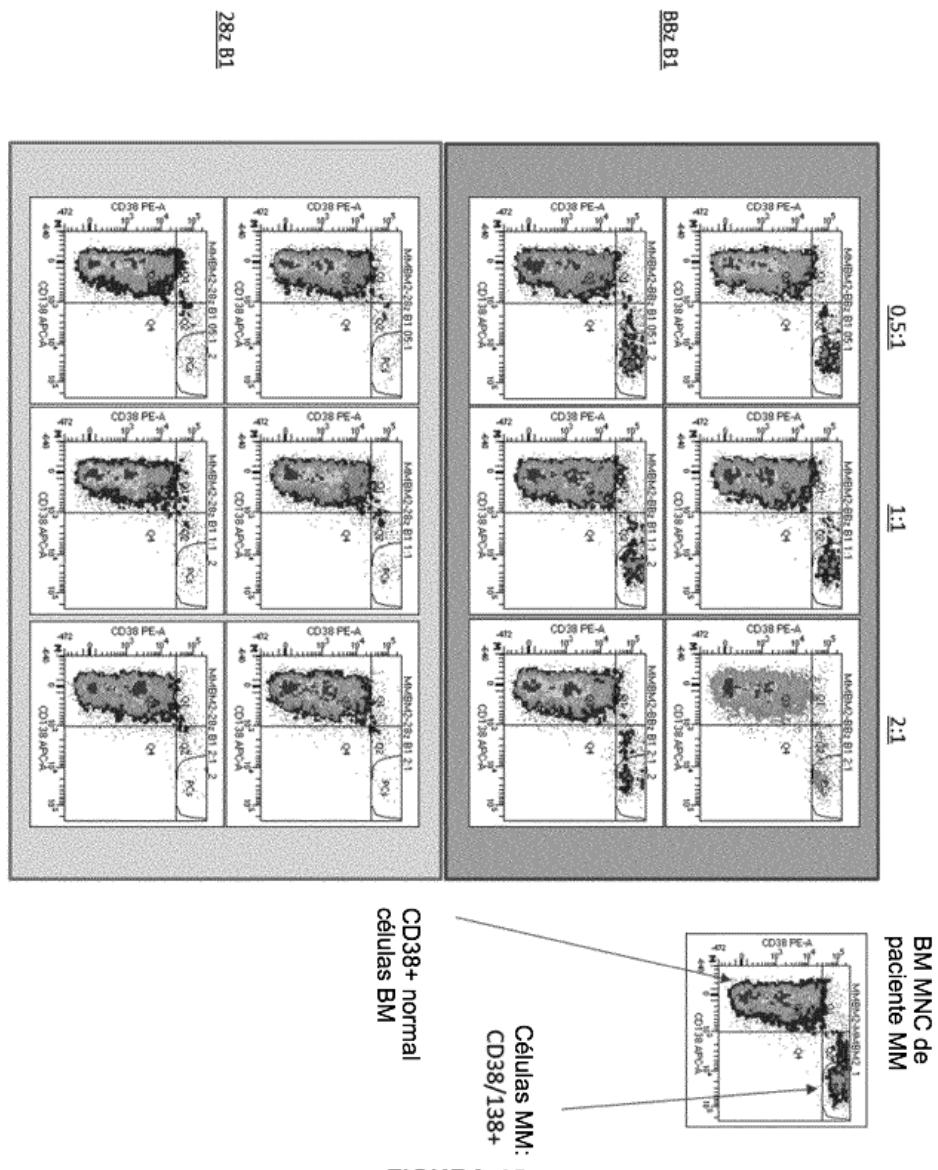
**FIGURA 20**

**FIGURA 21**



**FIGURA 22**

**FIGURA 23****FIGURA 24**



**FIGURA 25**

