

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 976 236**

51 Int. Cl.:

<b>A61P 35/00</b>	(2006.01)	<b>C07K 14/705</b>	(2006.01)
<b>A61P 43/00</b>	(2006.01)	<b>C07K 16/30</b>	(2006.01)
<b>A61K 38/20</b>	(2006.01)		
<b>A61K 39/395</b>	(2006.01)		
<b>A61K 35/17</b>	(2015.01)		
<b>C07K 14/54</b>	(2006.01)		
<b>C07K 16/28</b>	(2006.01)		
<b>C12N 5/0783</b>	(2010.01)		
<b>A61K 39/00</b>	(2006.01)		
<b>C07K 14/725</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.04.2016 PCT/US2016/029203**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2016 WO16172703**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2016 E 16784085 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2024 EP 3286223**

54 Título: **Receptores del antígeno quimérico de antígenos de mieloma kappa y usos de estos**

30 Prioridad:

**23.04.2015 US 201562151968 P**  
**07.05.2015 US 201562158407 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.07.2024**

73 Titular/es:

**HAEMALOGIX LTD (100.0%)**  
**Suite 204 80 William Street**  
**Woolloomooloo NSW 2011, AU**

72 Inventor/es:

**MICKLETHWAITE, KENNETH;**  
**DUNN, ROSANNE;**  
**GOTTLIEB, DAVID y**  
**LOGAN, GRANT**

74 Agente/Representante:

**MENDIGUTÍA GÓMEZ, María Manuela**

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 976 236 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

Receptores del antígeno quimérico de antígenos de mieloma kappa y usos de estos

5 Antecedentes de la invención

El mieloma múltiple (MM) es una malignidad de las células de plasma en la médula ósea que, a pesar de los avances recientes del tratamiento, sigue siendo incurable. La trayectoria clínica se caracteriza por una respuesta inicial al tratamiento, seguida de la recaída repetida con resistencia eventual a todas las formas de tratamiento. También está asociado con morbilidad y discapacidad significativas debido a la enfermedad propia y a la toxicidad de los tratamientos disponibles.

El mieloma múltiple también se caracteriza por las células de plasma malignas que segregan paraproteína monoclonal restringida de la cadena liviana kappa o lamda. La restricción de kappa sucede en 60 % de los pacientes de mieloma y la expresión del antígeno de mieloma kappa (KMA) está altamente restringida a las malignidades de mieloma múltiple y linfocitos B. KappaMab es un anticuerpo monoclonal específico de KMA que demostró seguridad y eficacia en los ensayos clínicos de fase I y II.

El tratamiento con anticuerpos monoclonales por su cuenta no es una cura con la erradicación incompleta del tumor que conduce a la recaída eventual. Esto puede deberse a la penetración inadecuada del anticuerpo en el tumor (a través de difusión pasiva), la heterogeneidad de la expresión del antígeno en las células tumorales o la resistencia de las células tumorales a los mecanismos de la citotoxicidad dependiente del anticuerpo. Por lo tanto, existe una necesidad de tratamientos eficaces con baja toxicidad que puedan proporcionar una cura de la enfermedad a largo plazo.

Los linfocitos T que portan el receptor del antígeno quimérico (linfocitos T CAR) representan una posible solución a este problema. Los linfocitos T CAR incorporan el dominio de unión al antígeno de los anticuerpos monoclonales con uno o más dominios intracelulares de señalización de linfocitos T para producir una respuesta inmunitaria localizada específica del tumor. Los linfocitos T CAR tienen diversas ventajas sobre los anticuerpos monoclonales: migran activamente hacia el tumor, proliferan en respuesta a las células tumorales que portan el antígeno, segregan factores que reclutan otros brazos de la respuesta inmunitaria y sobreviven a largo plazo para proporcionar la protección en curso contra la recaída. Otro beneficio de los linfocitos T CAR sobre un anticuerpo terapéutico dirigido al mismo antígeno es que el linfocito T CAR también puede modificarse para mejorar la seguridad y funcionalidad. Por ejemplo, un linfocito T puede modificarse para incluir la expresión de un receptor guiado que mejora la especificidad de los linfocitos T y la habilidad de los linfocitos T para infiltrar células o tumores cancerosos o pueden incluir un "interruptor de apagado" que puede funcionar para eliminar células cuando ocurre la toxicidad. Además, y de suma importancia para el tratamiento de mieloma múltiple y sus trastornos relacionados, los linfocitos T pueden modificarse para expresar moléculas adicionales biológicamente activas o farmacéuticamente activas que pueden mejorar la respuesta antitumoral, tal como, por ejemplo, citocinas de supresión tumoral. Como se describe en la presente, los inventores actuales diseñaron constructos CAR novedosos que son capaces de unirse específicamente a un epítipo de KMA conformacional expresado solo en células MM y que modificaron los linfocitos T CAR para expresar un dominio específico de unión al antígeno extracelular para este epítipo y dominio de señalización de linfocito T intracelular por separado o en combinación con la expresión de otros mediadores inmunitarios antitumorales.

Vera et al. (2016; BLOOD, vol. 108, N.º 12) describe que los linfocitos T redirigidos contra la  $\kappa$  cadena liviana de inmunoglobulina humana elimina eficazmente las células malignas derivadas de linfocitos T maduros.

Breve descripción de la invención

La presente invención proporciona un receptor del antígeno quimérico (CAR) que comprende uno o más dominios intracelulares de señalización y un dominio de unión al antígeno extracelular, en donde el dominio extracelular de unión al antígeno comprende un fragmento variable monocatenario (scFv) que une específicamente el antígeno de mieloma kappa (KMA), en donde el scFv comprende regiones que determinan complementariedad (CDR) derivadas de un anticuerpo monoclonal Kappa (KappaMab), en donde las CDR KappaMab comprenden SEQ ID NO: 3-8. La invención también proporciona linfocitos T modificados genéticamente para expresar estos CAR.

La presente invención también proporciona linfocitos T modificados genéticamente para expresar receptores del antígeno quimérico (CAR), en donde cada CAR comprende uno o más dominios intracelulares de señalización y un dominio extracelular de unión al antígeno, en donde el dominio extracelular de unión al antígeno comprende un fragmento variable monocatenario (scFv) que une específicamente KMA, en donde el scFv comprende regiones que determinan complementariedad (CDR) derivadas de un anticuerpo monoclonal Kappa (KappaMab), en donde las CDR KappaMab comprenden SEQ ID NO: 3-8, para su uso en un método para tratar una malignidad que expresa KMA en un sujeto.

Los receptores del antígeno quimérico (CAR) de la presente invención comprenden uno o más dominios intracelulares de señalización y un dominio extracelular de unión al antígeno, en donde el dominio extracelular de unión al antígeno comprende un fragmento variable monocatenario (scFv) que une específicamente el antígeno de mieloma kappa (KMA), en donde el scFv comprende regiones que determinan complementariedad (CDR) derivadas de un anticuerpo monoclonal Kappa (KappaMab), en donde las CDR KappaMab comprenden SEQ ID NO: 3-8. En una forma de realización, el dominio intracelular de señalización es uno o más endodominios coestimuladores. En una forma de realización, el uno o más dominios coestimuladores es uno o más de un dominio CD28, un dominio  $\zeta$  CD3, un dominio 4-1BB o un dominio OX-40 o combinaciones de estos. En una forma de realización, el uno o más endodominios coestimuladores del CAR comprende un dominio  $\zeta$  CD3 y un dominio CD28. En otra forma de realización, el uno o más endodominios coestimuladores del CAR comprende un dominio  $\square$  CD3 y un dominio OX-40. En aún otra forma de realización, el uno o más endodominios coestimuladores del CAR comprende un dominio  $\zeta$  CD3, un dominio CD28 y un dominio OX-40. En aún otra forma de realización, el uno o más endodominios coestimuladores del CAR comprende un dominio  $\zeta$  CD3 y un dominio 4-1BB. En aún otra forma de realización, el uno o más endodominios coestimuladores del CAR comprende un dominio  $\zeta$  CD3, un dominio CD28 y un dominio 4-1BB. En aún otra forma de realización, el uno o más endodominios coestimuladores del CAR comprende un dominio  $\zeta$  CD3, un dominio 4-1BB y un dominio OX-40.

El dominio extracelular de unión comprende un fragmento variable monocatenario (scFv) que une específicamente KMA, en donde el scFv comprende regiones que determinan complementariedad (CDR) derivadas de un anticuerpo monoclonal Kappa (KappaMab), en donde las CDR KappaMab comprenden SEQ ID NO: 3-8. En una forma de realización, el scFv comprende las CDR VL de SEQ ID NO: 6-8. En otra forma de realización, el scFv comprende la región VL de SEQ ID NO: 21. En aún otra forma de realización, el scFv comprende las CDR VH de SEQ ID NO: 3-5. En otra forma de realización, el scFv comprende la región VH de SEQ ID NO: 22. En una forma de realización adicional, el scFv comprende las CDR VL de SEQ ID NO: 6-8 y las CDR VH de SEQ ID NO: 3-5. En otra forma de realización adicional, el scFv comprende la región VL de SEQ ID NO: 21 y la región VH de SEQ ID NO: 22. En una forma de realización, la cadena VL de SEQ ID NO: 2 y la cadena VH de SEQ ID NO: 1 están unidos a mediante un ligador de glicina-serina. En una forma de realización, la región VL de SEQ ID NO: 21 y la región VH de SEQ ID NO: 22 están unidos a mediante un ligador de glicina-serina. En aún otra forma de realización, el ligador es un (Gly4Ser) $x$  donde  $x$  es 1-5. En aún otra forma de realización, el ligador de glicina-serina es un ligador de 15-20 aminoácidos. En aún otra forma de realización, el ligador es un ligador de glicerina y serina de 15 aminoácidos y comprende (Gly4Ser) $_3$ . En una forma de realización, el ligador (Gly4Ser) $_3$  es SEQ ID NO: 23. En una forma de realización, el scFv está acoplado al uno o más dominios intracelulares de señalización con un espaciador. En aún otra forma de realización, el scFv está acoplado al uno o más dominios intracelulares por un espaciador que comprende una región constante de inmunoglobulina. En una forma de realización, la región constante de inmunoglobulina comprende uno o más de una bisagra IgG, un dominio CH2 de IgG y un dominio CH3 de IgG. En una forma de realización particular, la región constante de inmunoglobulina comprende un dominio de bisagra de inmunoglobulina. En aún otra forma de realización, la región constante de inmunoglobulina comprende un dominio CH3 de inmunoglobulina. En aún otra forma de realización, la región constante de inmunoglobulina comprende un dominio CH2 de IgG. En aún otra forma de realización, el scFv está acoplado al uno o más dominios intracelulares por un espaciador que comprende un dominio  $\alpha$  CD8. En una forma de realización, el espaciador está acoplado al scFv a través de un ligador de glicina-serina. En aún otra forma de realización, el ligador es un (Gly4Ser) $x$  donde  $x$  es 1-5. En aún otra forma de realización, el ligador de glicina-serina es un ligador de 15-20 aminoácidos. En aún otra forma de realización, el ligador es un ligador de glicerina y serina de 15 aminoácidos y comprende (Gly4Ser) $_3$ . En una forma de realización, el ligador (Gly4Ser) $_3$  es SEQ ID NO: 23.

La invención proporciona linfocitos T modificados genéticamente para expresar los receptores del antígeno quimérico (linfocitos T CAR) de la invención. Los linfocitos T CAR comprenden CAR que comprenden uno o más dominios intracelulares de señalización y un dominio extracelular de unión. El dominio extracelular de unión comprende un fragmento variable monocatenario (scFv) que une específicamente un antígeno de mieloma kappa, en donde el scFv comprende regiones que determinan complementariedad (CDR) derivadas de un anticuerpo monoclonal Kappa (KappaMab), en donde las CDR KappaMab comprenden SEQ ID NO: 3-8. En una forma de realización, los linfocitos T CAR se modifican adicionalmente para expresar una o más moléculas biológicas adicionales. En una forma de realización, la una o más moléculas adicionales comprenden IL-12 y/o SANT7 y/o Galectina -3C (GAL3C). En una forma de realización, los linfocitos T CAR expresan un polipéptido monocatenario que comprende una subunidad IL-12 p35 y una subunidad IL-12 p40 unidas por medio de un ligador flexible. En una forma de realización IL-12 p35 y IL-12 p40 están unidos por medio de un ligador (G4S) $_3$ . En una forma de realización, el polipéptido monocatenario IL-12 forma un heterodímero IL-12 p70 bioactivo. En una forma de realización, los linfocitos T CAR expresan IL-12 y un marcador seleccionable. En una forma de realización, la una o más moléculas biológicas son SANT7. En una forma de realización, los linfocitos T CAR expresan GAL3C. En una forma de realización, los linfocitos T CAR expresan GAL3C y un marcador seleccionable. En una forma de realización, los linfocitos T CAR expresan SANT7 y GAL3C. En una forma de realización, los linfocitos T CAR expresan SANT7, GAL3C y un marcador seleccionable. En una forma de realización, los linfocitos T CAR expresan IL-12 y GAL3C. En una forma de realización, los linfocitos T CAR

expresan IL-12, GAL3C y un marcador seleccionable. En una forma de realización, los linfocitos T CAR expresan SANT7 y un marcador seleccionable. En una forma de realización, los linfocitos T CAR expresan IL-12 y SANT7. En una forma de realización, los linfocitos T CAR expresan IL-12, SANT7 y un marcador seleccionable. En una forma de realización, los linfocitos T CAR expresan IL-12, SANT7 y GAL3C. En una forma de realización, los linfocitos T CAR expresan IL-12, SANT7, GAL3C y un marcador seleccionable.

En una forma de realización, los linfocitos T CAR de la presente invención también expresan una proteína de unión de factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) capaz de inhibir la señalización de HGF y la función efectora. En un aspecto, la proteína de unión de HGF es un anticuerpo o fragmento de este.

En una forma de realización, se proporcionan linfocitos T modificados genéticamente para expresar receptores del antígeno quimérico (CAR), en donde cada CAR comprende uno o más dominios intracelulares de señalización y un dominio extracelular de unión al antígeno, en donde el dominio extracelular de unión al antígeno comprende un fragmento variable monocatenario (scFv) que une específicamente KMA, en donde el scFv comprende regiones que determinan complementariedad (CDR) derivadas de un anticuerpo monoclonal Kappa (KappaMab), en donde las CDR KappaMab comprenden SEQ ID NO: 3-8, para su uso en un método para tratar una malignidad que expresa KMA. En una forma de realización, la malignidad que expresa KMA es una malignidad de linfocitos B. En una forma de realización adicional, la malignidad de linfocitos B es mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma de linfocitos B grandes difuso (DLBCL) o amiloidosis. En una forma de realización, el método incluye administrar a un sujeto con mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma de linfocitos B grandes difuso (DLBCL), amiloidosis u otra malignidad de linfocitos B que expresa linfocitos T modificados genéticamente por KMA para expresar receptores del antígeno quimérico (CAR), en donde cada CAR comprende uno o más dominios intracelulares de señalización y un dominio extracelular de unión al antígeno, en donde el dominio extracelular de unión al antígeno comprende un fragmento variable monocatenario (scFv) que une específicamente KMA, en donde el scFv comprende regiones que determinan complementariedad (CDR) derivadas de un anticuerpo monoclonal Kappa (KappaMab), en donde las CDR KappaMab comprenden SEQ ID NO: 3-8. En una forma de realización, el uno o más dominios intracelulares de señalización en el CAR es uno o más endodominios coestimuladores. En una forma de realización, el uno o más dominios coestimuladores es uno o más de un dominio CD28, un dominio  $\zeta$  CD3, un dominio 4-1BB o un dominio OX-40 o combinaciones de estos. En una forma de realización, el uno o más endodominios coestimuladores del CAR comprende un dominio  $\zeta$  CD3 y un dominio CD28. En otra forma de realización, el uno o más endodominios coestimuladores del CAR comprende un dominio  $\zeta$  CD3 y un dominio OX-40. En aún otra forma de realización, el uno o más endodominios coestimuladores del CAR comprende un dominio  $\zeta$  CD3, un dominio CD28 y un dominio OX-40. En aún otra forma de realización, el uno o más endodominios coestimuladores del CAR comprende un dominio  $\zeta$  CD3 y un dominio 4-1BB. En aún otra forma de realización, el uno o más endodominios coestimuladores del CAR comprende un dominio  $\zeta$  CD3, un dominio CD28 y un dominio 4-1BB. En aún otra forma de realización, el uno o más endodominios coestimuladores del CAR comprende un dominio  $\zeta$  CD3, un dominio 4-1BB y un dominio OX-40. En una forma de realización, el dominio extracelular de unión comprende un fragmento variable monocatenario (scFv) que reconoce específicamente KMA. En aún otra forma de realización, el scFv comprende las regiones de determinación de complementariedad (CDR) derivadas de KappaMab. En aún otra forma de realización, el scFv comprende las CDR VL de SEQ ID NO: 6-8. En otra forma de realización, el scFv comprende la región VL de SEQ ID NO: 21. En aún otra forma de realización, el scFv comprende las CDR VH de SEQ ID NO: 3-5. En otra forma de realización, el scFv comprende la región VH de SEQ ID NO: 22. En una forma de realización adicional, el scFv comprende las CDR VL de SEQ ID NO: 6-8 y las CDR VH de SEQ ID NO: 3-5. En otra forma de realización adicional, el scFv comprende la región VL de SEQ ID NO: 21 y la región VH de SEQ ID NO: 22. En una forma de realización, la cadena VL de SEQ ID NO: 2 y la cadena VH de SEQ ID NO: 1 están unidos a mediante un ligador de glicina-serina. En una forma de realización, la región VL de SEQ ID NO: 21 y la región VH de SEQ ID NO: 22 están unidos a mediante un ligador de glicina-serina. En aún otra forma de realización, el ligador es un (Gly4Ser) $x$  donde  $x$  es 1-5. En aún otra forma de realización, el ligador de glicina-serina es un ligador de 15-20 aminoácidos. En aún otra forma de realización, el ligador es un ligador de glicerina y serina de 15 aminoácidos y comprende (Gly4Ser) $_3$ . En una forma de realización, el ligador (Gly4Ser) $_3$  es SEQ ID NO: 23. En una forma de realización, el scFv está acoplado al uno o más dominios intracelulares de señalización con un espaciador. En aún otra forma de realización, el scFv está acoplado al uno o más dominios intracelulares por un espaciador que comprende una región constante de inmunoglobulina. En una forma de realización, la región constante de inmunoglobulina comprende uno o más de una bisagra IgG, un dominio CH2 de IgG y un dominio CH3 de IgG. En una forma de realización particular, la región constante de inmunoglobulina comprende un dominio de bisagra de inmunoglobulina. En aún otra forma de realización, la región constante de inmunoglobulina comprende un dominio CH3 de inmunoglobulina. En aún otra forma de realización, la región constante de inmunoglobulina comprende un dominio CH2 de IgG. En aún otra forma de realización, el scFv está acoplado al uno o más dominios intracelulares por un espaciador que comprende un dominio  $\alpha$  CD8. En una forma de realización, el espaciador está acoplado al scFv a través de un ligador de glicina-serina. En aún otra forma de realización, el ligador es un (Gly4Ser) $x$  donde  $x$  es 1-5. En aún otra forma de realización, el ligador de glicina-serina es un ligador de 15-20 aminoácidos. En aún otra forma de realización, el ligador es un ligador de glicerina y serina de 15 aminoácidos y comprende (Gly4Ser) $_3$ . En una forma de realización, el ligador (Gly4Ser) $_3$  es SEQ ID NO: 23.

En otra forma de realización, los linfocitos T modificados genéticamente se modifican adicionalmente para expresar una o más moléculas biológicas adicionales. En una forma de realización, la una o más moléculas adicionales comprenden IL-12 y/o SANT7 y/o GAL3C. En una forma de realización, los linfocitos T CAR expresan un polipéptido monocatenario que comprende una subunidad IL-12 p35 y una subunidad IL-12 p40 unidas por medio de un ligador flexible. En una forma de realización IL-12 p35 y IL-12 p40 están unidos por medio de un ligador (G4S)<sub>3</sub>. En una forma de realización, el polipéptido monocatenario IL-12 forma un heterodímero IL-12 p70 bioactivo. En una forma de realización, los linfocitos T CAR expresan IL-12 y un marcador seleccionable. En una forma de realización, la una o más moléculas biológicas son SANT7. En una forma de realización, los linfocitos T CAR expresan SANT7 y un marcador seleccionable. En una forma de realización, el marcador seleccionable es GAL3C. En una forma de realización, los linfocitos T CAR expresan GAL3C y un marcador seleccionable. En una forma de realización, los linfocitos T CAR expresan IL-12, SANT7 y un marcador seleccionable. En una forma de realización, los linfocitos T CAR expresan IL-12, GAL3C y un marcador seleccionable. En una forma de realización, los linfocitos T CAR expresan SANT7, GAL3C y un marcador seleccionable. En una forma de realización, los linfocitos T CAR expresan IL-12, SANT7, GAL3C y un marcador seleccionable.

En una forma de realización adicional, el uso de los linfocitos T modificados genéticamente de la invención incluyen administrar además a un paciente con mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, un linfoma de linfocitos B grandes difuso (DLBCL), amiloidosis u otra malignidad de linfocitos B que expresa KMA y una proteína de unión de HGF. En una forma de realización, la proteína de unión de HGF es un anticuerpo o fragmento de este.

En otra forma de realización, el uso de los linfocitos T modificados de la invención incluye administrar uno o más agentes adicionales biológicamente activos o farmacéuticamente activos. En una forma de realización, el uno o más agentes adicionales farmacéuticamente activos son un agente quimioterapéutico. En otra forma de realización, el uno o más agentes farmacéuticamente activos son un fármaco inmunomodulatorio. En una forma de realización particular, el fármaco inmunomodulatorio es talidomida o un análogo de esta. En aún otra forma de realización, el análogo de talidomida es actimida, lenalidomida o pomalidomida. En aún otra forma de realización, el uno o más agentes adicionales farmacéuticamente activos son un inhibidor de histona desacetilasa. En aún otra forma de realización, el inhibidor de histona desacetilasa es panobinostat, vorinostat, trichostatina A, depsipéptidos, fenilbutirato, ácido valproico, belinostat, LAQ824, entinostat, CI944 o mocetinostat. En aún otra forma de realización, el uno o más agentes adicionales biológicamente activos o farmacéuticamente activos se administran antes, durante o después del tratamiento con dichos linfocitos T modificados genéticamente. En aún otra forma de realización, los linfocitos T modificados genéticamente se administran por vía intravenosa. En aún otra forma de realización, los linfocitos T modificados genéticamente derivan de dicho paciente. En aún otra forma de realización, los linfocitos T modificados genéticamente no derivan de dicho paciente.

En una forma de realización, el uso de los linfocitos T modificados de la invención incluye la administración de los linfocitos T CAR antes, durante o después de un trasplante alogénico de célula madre.

Los aspectos caracterizados anteriormente, así como los demás aspectos, de la presente invención están ejemplificados en una cantidad de implementaciones y aplicaciones ilustradas, algunas de las cuales se muestran en las figuras y están caracterizadas en la sección de reivindicaciones a continuación.

#### Breve descripción de los dibujos

Las características novedosas de la invención se establecen en particular en las reivindicaciones adjuntas. Se obtiene una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención por medio de la referencia a la siguiente descripción detallada, que establece formas de realización ilustrativas, en donde se utilizan los principios de la invención, y los dibujos adjuntos, en los cuales:

Las **Figuras 1A-1B** muestran la relación estructural de CAR a inmunoglobulina (IgG) y la **Figura 1A** del receptor de linfocitos T (TCR) muestra un fragmento de variable monocatenario (scFv) que consiste en la región variable (VL) de la cadena liviana del anticuerpo progenitor acoplado a la región variable de la cadena pesada (VH) mediante un ligador de polipéptido que confiere especificidad de antígeno al CAR. Una bisagra flexible conecta el scFv a la transmembrana y al dominio de señalización intracelular de una molécula coestimuladora tal como CD28, 4-1 BB u OX-40 seguido de CD3 zeta. La **Figura 1B** muestra que los linfocitos T transducidos con el CAR se activan cuando encuentran células tumorales que portan el antígeno diana (Ag) que conduce a la lisis de la célula tumoral. La **Figura 2** muestra los determinantes estructurales de la función del receptor del antígeno quimérico.

La **Figura 3** muestra la expresión de KMA en las células primarias de mieloma.

Las **Figuras 4A-4C** muestra la función KMA.CAR-28z. La **Figura 4A** es un análisis de citometría de flujo de la expresión de KMA en diversas líneas celulares; la **Figura 4B** es expresión de interferón-gamma (IFN $\gamma$ ) de linfocitos T CD8<sup>+</sup> transducidos por KMA.CAR-28z (lotes superiores) y no transducidos (lotes inferiores) La **Figura**

**4C** muestra la lisis específica de líneas celulares de KMA positivo y negativo por linfocitos T transducidos por KMA.CAR-28z.

La **Figura 5A** muestra ratones RPMI-Rag inyectados con  $5 \times 10^5$ - $5 \times 10^6$  células de mieloma, la **Figura 5B** muestra la infiltración de la médula ósea y el bazo con células CD138+ RPMI9226, la **Figura 5C** muestra niveles elevados de suero humano lambda de la cadena liviana en enfermedades progresivas, la **Figura 5D** muestra células positivas de la cadena liviana CD138+/citoplásmicas en la médula ósea, la **Figura 5E** muestra ratones RPMI-Rag como un modelo terapéutico.

Las **Figuras 6A-6C** muestran la optimización de KMA.CAR, la **Figura 6A** muestra el constructo KMA.CAR-28z inicial; la **Figura 6B** muestra constructos con bisagra de la cadena pesada Ig y CH3 o la bisagra por separado, la **Figura 6C** muestra constructos que combinan la región de bisagra opcional (opti) con combinaciones de diversos endodominios de molécula coestimuladora y CD3 zeta.

La **Figura 7** muestra los vectores IL-12 y SANT7.

Las **Figuras 8A-8B** muestran la expansión de linfocitos T KM.CAR y la expresión de CAR con constructos descritos en el Ejemplo 3. La **Figura 8A** muestra la expansión de células totales en los cultivos de linfocitos T CAR con (izquierda) y sin (derecha) la adición de las líneas celulares de JJN3 que expresan KMA. La expresión de CAR de la **Figura 8B** medida mediante GFP en cultivos con (lotes superiores) y sin (lotes inferiores) la línea celular de JJN3 que expresa KMA. Linfocitos T hCH2CH3= KM.CAR\_hCH2CH3\_28z; linfocitos T hCH2CH3mut= KM.CARhCH2CH3mut\_28TM\_41BBz; linfocitos T h=KM.CAR\_h\_28TM\_41BBz; linfocitos T CD8a= KM.CAR\_8a\_28TM\_41BBz.

La **Figura 9** muestra la estructura del casete de transposón inducible por activación. IR= repeticiones invertidas; Ins= aislador que flanquea los dos extremos del inserto genético; NFATpro= promotor inducible por activación; BGHPA= señal de poliadenilación de hormona de crecimiento bovina; EF1α= promotor alfa de factor-1 de elongación humano; RQR8= marcador; SV40= señal de poliadenilación tardía de virus de simio.

La **Figura 10** muestra la expresión de eGFP con el control del promotor inducido por activación. Los PBMC transducidos estimulados con PMA e Ionomicina (lote derecho) se evaluaron para la coexpresión de RQR8 (eje x) y eGFP (eje y) y se compararon con los controles no estimulados (lote izquierdo). Las células transducidas no expresaron eGFP en ausencia de la estimulación. Cincuenta por ciento de las células transducidas expresaron eGFP con estimulación.

La **Figura 11** muestra la estructura del casete de transposón inducible por activación con CAR y biológico. IR= repeticiones invertidas; Ins= aislador que flanquea los dos extremos del inserto genético; NFATpro= promotor inducible por activación; BGHPA= señal de poliadenilación de hormona de crecimiento bovina; EF1α= promotor alfa de factor-1 de elongación humano; SV40= señal de poliadenilación tardía de virus de simio.

Las **Figuras 12A-12B** muestran la producción de interferón-gamma específico de KMA y la toxicidad de linfocitos T KM.CAR\_hCH2CH3\_28z (**Figura 12A**) o el ensayo de liberación de cromo estándar de linfocitos T KM.CAR\_h\_28TM\_41BBz (**Figura 12B**) con KMA+ y líneas celulares de KMA. Las líneas celulares de KMA positivo utilizadas incluyeron JJN3, Pfeiffer, NCI-H929, mientras que las líneas celulares de KMA negativo incluyeron Nalm-6 y Molt.

#### Descripción detallada de la invención

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que el que comúnmente entienden las personas del oficio de nivel medio a quienes pertenece la invención. Aunque en la puesta en práctica de la presente invención para su evaluación se pueden usar cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente, en la presente se describen los materiales y métodos preferidos. En la descripción y reivindicación de la presente invención, se pueden utilizar las siguientes definiciones. También debe entenderse que la terminología utilizada en la presente no pretende ser limitativa, sino que se usa en la presente con el propósito de describir formas de realización particulares.

Los artículos "un" y "una" se usan en la presente para referirse a uno o más de uno (es decir, al menos uno o a uno o más) de los objetos gramaticales del artículo.

El término "vector de expresión" como se usa en la presente se refiere a un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos recombinante que comprende al menos una secuencia de control de expresión unida operativamente a la secuencia de ácidos nucleicos a expresar. Un vector de expresión comprende todos los elementos reguladores de cis necesarios para la expresión. Los ejemplos de los vectores de expresión incluyen, entre otros, plásmidos, cósmidos y virus que codifican el polinucleótido recombinante a expresar. El

vector de expresión puede comprender elementos de transposición capaces de integrarse en el genoma, por ejemplo, el sistema de expresión PiggyBac. El vector de expresión puede ser un vector viral que permita la integración de los contenidos del vector de expresión en el genoma huésped, por ejemplo, los vectores retrovirales y lentivirales.

El término "receptor del antígeno quimérico" o "CAR" significa un receptor modificado que incluye un dominio extracelular de unión al antígeno y un dominio de señalización intracelular. El tipo más común de CAR comprende un fragmento variable monocatenario (scFv) derivado de un anticuerpo monoclonal fusionado a un dominio transmembrana y un dominio intracelular de un correceptor de linfocitos T, tal como la cadena  $\zeta$  CD3. En cambio, como se usa en la presente, el término "receptor del antígeno quimérico" o "CAR" se refiere a cualquier receptor modificado para expresar un dominio extracelular de unión al antígeno fusionado o unido a cualquier molécula intracelular de señalización.

Como se usa en la presente, el término "linfocitos T CAR" se refiere a un linfocito T modificado genéticamente para expresar un CAR. La definición de linfocitos T CAR incluye todas las clases y subclases de linfocitos T incluidos linfocitos T CD4+, CD8+ así como los linfocitos T efectoros, linfocitos T de memoria, linfocitos T reguladores, y similares. Los linfocitos T que se modifican genéticamente pueden "derivarse" u "obtenerse" del sujeto que recibirá el tratamiento con el uso de los linfocitos T modificados genéticamente o que pueden "derivarse" u "obtenerse" de un sujeto diferente.

El término "dominio intracelular de señalización" significa la parte del CAR que se encuentra o que se modifica para encontrarse dentro del linfocito T. El "dominio intracelular de señalización" puede o no contener un "dominio transmembrana" que ancla el CAR en la membrana plasmática de un linfocito T. En una forma de realización, el "dominio transmembrana" y el "dominio intracelular de señalización" derivan de la misma proteína (por ejemplo CD3 $\zeta$ ) en otras formas de realización; el dominio intracelular de señalización y el dominio transmembrana derivan de diferentes proteínas (por ejemplo, el dominio transmembrana de un CD3 $\zeta$  y el dominio intracelular de señalización de una molécula CD28, o viceversa).

El término "endodominio coestimulador" se refiere a un dominio intracelular de señalización o un fragmento de este que deriva de una molécula coestimuladora de linfocitos T. Una lista no limitativa de moléculas de coestimuladoras de linfocitos T incluye CD3, CD28, OX-40, 4-1BB, CD27, CD270, CD30 e ICOS. El endodominio coestimulador puede o no incluir un dominio transmembrana del mismo endodominio coestimulador o de uno diferente.

El término "dominio extracelular de unión al antígeno" significa la parte del CAR que específicamente reconoce y se une al antígeno de interés. El "dominio de unión extracelular" deriva de un anticuerpo monoclonal. En todas las formas de realización, el "dominio de unión extracelular" incluye las regiones que determinan complementariedad derivadas de un anticuerpo monoclonal Kappa (KappaMab), en donde las CDR KappaMab comprenden SEQ ID NO: 3-8. En todas formas de realización, el dominio extracelular de unión es un fragmento variable monocatenario (scFv).

El término "fragmento variable monocatenario" o "scFv" significa una proteína de fusión de las cadenas de variable pesada (VH) y variable liviana (VL) de un anticuerpo con un ligador peptídico entre la VL y VH. La longitud y la composición del ligador varían en función de las partes del anticuerpo utilizadas, pero generalmente tienen una longitud de entre 10 y 25 aminoácidos. En algunas formas de realización, el ligador peptídico es rico en glicina para proporcionar flexibilidad. En algunas formas de realización, el ligador también incluye serina y/o teonina que pueden, sin limitarse a la teoría, asistir en la solubilidad. En algunas formas de realización, el ligador es un aminoácido con SEQ ID NO: 23. Los scFv están designados para retener la especificidad de unión al antígeno del anticuerpo progenitor del cual derivan las cadenas variables a pesar de carecer de la cadena pesada de inmunoglobulina. En algunas formas de realización, solo se usan las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de VH y VL en el scFv. En algunas formas de realización, se usa la totalidad de las cadenas VL y VH.

Como se usa en la presente, el término "anticuerpo" se refiere a una molécula de inmunoglobulina que se unen específicamente a un antígeno. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas intactas derivadas de fuentes naturales o recombinantes y pueden ser partes inmunorreactivas de inmunoglobulinas intactas. Los anticuerpos de la presente invención pueden existir en una diversidad de formas que incluyen, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, Fv, Fab y F(ab)<sub>2</sub>, así como anticuerpos monocatenarios y anticuerpos humanizados (Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426). Como se usa en la presente, el término "anticuerpo" también incluye fragmentos del anticuerpo.

La expresión "fragmento de anticuerpo" se refiere a una porción de un anticuerpo intacto y se refiere a las regiones variables determinantes de antígeno de un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de

anticuerpo incluyen, entre otros, fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv, anticuerpos lineales, anticuerpos de scFv y anticuerpos multiespecíficos formados con fragmentos de anticuerpo.

Como se usa en la presente, una "cadena pesada de anticuerpo" se refiere al más grande de los dos tipos de cadenas de polipéptidos presentes en todas las moléculas de anticuerpo en sus conformaciones naturales

Como se usa en la presente, una "cadena liviana de anticuerpo" se refiere al más pequeño de los dos tipos de cadenas de polipéptidos presentes en todas las moléculas de anticuerpo en sus conformaciones naturales, y las cadenas livianas  $\kappa$  y  $\lambda$  se refieren a los dos isótopos de la cadena liviana de anticuerpo principales.

Como se usa en la presente, el término "región de determinación de complementariedad" o "CDR" se refiere a la parte de las dos cadenas variables de anticuerpos (cadenas pesadas y livianas) que reconocen y se unen al antígeno particular. Las CDR son la parte más variable de las cadenas variables y le proporcionan al anticuerpo su especificidad. Existen otras CDR en cada una de las cadenas de variable pesada (VH) y variable liviana (VL) y, por lo tanto, existe un total de seis CDR por molécula de anticuerpo.

El término "KappaMab" significa el anticuerpo monoclonal designado anteriormente como IST-1097 o MDX-1097. Además, como se usa en la presente, KappaMab se puede referir a la totalidad de la secuencia del anticuerpo del anticuerpo KappaMab (ver, por ejemplo, las patentes estadounidenses N.º 7.344.715 y 7.556.803). Además, el término "KappaMab", como se usa en la presente, se utiliza para englobar a todos los polipéptidos que contienen las secuencias de CDR de SEQ ID NO: 3-8 y/o la secuencia VL de SEQ ID NO: 2 y la secuencia VH de SEQ ID NO: 1. Como se usa en la presente, el término "KappaMab" puede incluir cualquier polipéptido que contiene la secuencia VL de SEQ ID NO: 21 y la secuencia VH de SEQ ID NO: 22. En las composiciones y métodos de la presente invención, KappaMab puede incluir la totalidad del anticuerpo monoclonal de cualquier fragmento de unión al antígeno de este incluidos Fab y scFv.

Como se usa en la presente, los términos "antígeno" o "Ag" se definen como una molécula reconocida por un receptor de célula inmunitaria (por ejemplo, un receptor de linfocitos T, receptor de linfocitos B/inmunoglobulina). En algunas formas de realización, un antígeno es una molécula que provoca una respuesta inmunitaria. Esta respuesta inmunitaria puede implicar la producción de anticuerpos o la activación de células inmunológicamente competentes específicas, liberación de mediadores citotóxicos o citocinas reguladoras inmunoestimuladoras. Las personas del oficio de nivel medio comprenderán que cualquier macromolécula, incluidas prácticamente todas las proteínas o péptidos, puede servir como antígeno.

Como se usa en la presente, los términos "une específicamente" o "reconoce específicamente" como se usan en conexión con un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o CAR se refieren a un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o CAR que reconoce un antígeno específico, pero que no reconoce sustancialmente o no une sustancialmente otras moléculas en una muestra.

El término "salto ribosomal" se refiere a un mecanismo alternativo de traducción en el cual un péptido específico previene que el ribosoma de una célula se una de forma covalente a un aminoácido nuevo insertado y, en cambio, permite que este continúe la traducción, que da como resultado una división contraslativa de la poliproteína. El proceso lo induce un elemento de "salto ribosomal 2A" o elemento de hidrolasa regulador de cis (por ejemplo, la secuencia CHYSEL). En algunas formas de realización, esta secuencia comprende una secuencia de aminoácido no conservada con una propensión alfa-helicoidal fuerte seguida de una secuencia de consenso -D(V/I)ExNPG P, donde x=cualquier aminoácido. La división aparente ocurre entre G y P. En algunas formas de realización, el elemento de salto ribosomal es un elemento de salto ribosomal 2A. El elemento de salto ribosomal 2A puede ser un elemento de salto ribosomal 5' T2A.

Como se usa en la presente, "fármaco inmunomodulador" o "IMiD" es una clase de fármaco que constituye talidomida y sus análogos. Los análogos de talidomida incluyen lenalidomida, pomalidomida y apremilast.

Como se usa en la presente, el término "inhibidor de histona desacetilasa" o "inhibidor HDAC" o "HDI" se refiere a una clase de compuestos que interfiere con la función de histona desacetilasa. Los ejemplos de HDI incluyen, entre otros, ácidos hiroxámicos que incluyen, por ejemplo, tricostatin A, vorinostat (SAHA), belinostat (PXD101), LAQ824, panobinostat (LBH589); tripéptidos cíclicos, incluidos por ejemplo, depsipéptidos y tapoxin B; benzamidas, incluidas por ejemplo, entinostat (MS-275), C1994 y mocetinostat (MGCD0103); cetonas electrófilas; y compuestos alifáticos, tales como por ejemplo, fenilbutirato y ácido valproico.

Antígeno de Mieloma Kappa y anticuerpos

El antígeno de mieloma Kappa o KMA es un antígeno de membrana celular que se encuentra en la superficie de las células de mieloma. Específicamente, KMA consiste en cadenas livianas libres de kappa expresadas en asociación no covalente con actina en la membrana celular (Goodnow et al. (1985) J. Immunol. 135:1276). El anticuerpo monoclonal KappaMab se usa como una base para el dominio de unión al antígeno extracelular del CAR de la presente invención. El anticuerpo monoclonal designado KappaMab (formalmente designado IST-



1097, también conocido como MDX-1097) se une a un epítipo conformacional en la región de cambio de la cadena liviana libre de kappa humano que solo está disponible cuando la cadena liviana no está asociada con una cadena pesada y, por lo tanto, no se une a la cadena de kappa intacta que contiene IgG, IgM, IgE or IgA (Hutchinson et al. (2011) Mol. Immunol.). La expresión típica de KMA en las células de mieloma primarias derivadas de biopsias de médula ósea del paciente se muestran mediante la unión de KappaMab en la **Figura 3**. El anticuerpo KappaMab puede comprender la cadena VH de SEQ ID NO: 1 y la cadena VL de SEQ ID NO: 2. Específicamente, la cadena VH de KappaMab puede comprender las CDR de SEQ ID NO: 3-5 y las CDR VL de SEQ ID NO: 6-8. Además, KappaMab puede comprender la región VH de SEQ ID NO: 22 y una región VL de SEQ ID NO: 21.

#### Receptores del antígeno quimérico

Los receptores del antígeno quimérico (CAR) son receptores artificiales que consisten en las regiones de unión al antígeno tumoral de anticuerpos monoclonales y la parte de activación intracelular del complejo receptor de linfocitos T en una única cadena polipeptídica unida mediante una serie de ligadores y espaciadores (**Figuras 1A-1B**). Más comúnmente, los CAR son proteínas de fusión de fragmentos variables monocatenarios (ScFv) unidos al dominio transmembrana CD3ζ. Sin embargo, se pueden utilizar otros dominios de señalización intracelular tales como CD28, 41-BB y Ox40 en diversas combinaciones para proporcionar la señal intracelular deseada. En algunas formas de realización, los CAR proporcionados en la presente pueden comprender un péptido líder de la cadena pesada Ig. El péptido líder puede ser SEQ ID NO: 20.

#### I. Dominio extracelular de unión al antígeno

El CAR de la presente invención comprende un dominio extracelular de unión al antígeno de un anticuerpo monoclonal que es específico para uno o más epítopos KMA expresados en células MM. El CAR de la presente invención comprende un dominio extracelular de unión al antígeno derivado de KappaMab. El dominio extracelular de unión comprende las CDR VL de SEQ ID NO: 6-8 y las CDR VH de SEQ ID NO: 3-5. En una forma de realización, el dominio extracelular de unión es un scFv que comprende los dominios VL (SEQ ID NO: 2) y VH (SEQ ID NO: 1) de KappaMab. En otra forma de realización, el dominio extracelular de unión es un scFv que comprende los dominios VL (SEQ ID NO: 21) y VH (SEQ ID NO: 22) de KappaMab.

#### II. Ligador entre los dominios VL y VH de scFv de KappaMab

En una forma de realización, KappaMab VL está unido a KappaMab VH a través de un ligador flexible. Específicamente, un ligador flexible es un ligador de glicina/serina de alrededor de 10-30 aminoácidos (por ejemplo, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, o 5 aminoácidos) y comprende la estructura (Gly4Ser)<sub>3</sub>. En una forma de realización particular, el ligador tiene una longitud de 15 aminoácidos. La longitud del ligador es un determinante importante de un CAR. Sin limitarse a la teoría, ligadores más cortos pueden mejorar la afinidad, pero también pueden conducir a la formación de multímeros intracelulares, que impide la expresión del CAR, mientras que ligadores más largos tienden a disminuir la afinidad del antígeno al separar las CDR VL y VH en el espacio.

#### III. Espaciadores entre el dominio extracelular de unión al antígeno y el dominio intracelular de señalización

El dominio extracelular de unión al antígeno (por ejemplo scFv de KappaMab) está unido al dominio intracelular de señalización a través del uso de un "espaciador". El espaciador está diseñado para ser lo suficientemente flexible como para permitir la orientación del dominio de unión al antígeno de manera tal que facilite el reconocimiento y unión al antígeno. El espaciador puede derivar de inmunoglobulinas y puede incluir la región de bisagra IgG1 o las regiones CH2 y/o CH3 de un IgG. Alternativamente, la bisagra puede comprender una cadena CD8α en todo o en parte. La longitud y flexibilidad de los espaciadores dependen del dominio de reconocimiento del antígeno, así como de las regiones intracelulares de unión, y lo que puede ser funcional y/u óptimo para un constructo de CAR puede no serlo para otro CAR. En ciertas instancias, el espaciador puede designarse en la presente como "opti" (ver las **Figuras 6A-6C**) para significar que la identidad y longitud del espaciador óptimo varían en función de la parte extracelular de unión utilizada y de los dominios intracelulares de señalización seleccionados. En ciertas formas de realización, se usa una única bisagra IgG. En otras formas de realización, la bisagra IgG se usa en conjunto con la totalidad del dominio CH2 de IgG o con parte de este. En otras formas de realización, la bisagra IgG se usa en conjunto con la totalidad de un dominio CH3 de IgG o con parte de este. En otras formas de realización, la bisagra IgG se usa en conjunto con la totalidad de un dominio CH2 y CH3 de IgG o con parte de estos. En otras formas de realización, se usa la totalidad de un dominio CH2 de IgG o parte de este. En otras formas de realización, se usa la totalidad de un dominio CH3 de IgG o parte de este. En aún otras formas de realización, se usa la totalidad de un dominio CH2 y CH3 de IgG o parte de estos. En una forma de realización, los dominios bisagra, CH2 y CH3 utilizados en cualquiera de los constructos proporcionados en la presente comprenden una mutación de C a P en la región bisagra en la posición 103 del aminoácido de Uniprot P01857). En una forma de realización, los dominios bisagra, CH2 y CH3 utilizados en cualquiera de los

constructos proporcionados en la presente es SEQ ID NO: 24. En otra forma de realización, la bisagra se usa en conjunto con la totalidad de un dominio CH2 y CH3 de IgG o con parte de estos, en donde las mutaciones se introducen en aminoácidos importantes para la interacción de CH2 con receptores Fc. Estas mutaciones pueden mediar en la infusión posterior a la supervivencia mejorada al disminuir la interacción de Fc con los linfocitos T proporcionados en la presente. Un ejemplo de estas mutaciones se puede observar en el constructo KM.CAR\_hCH2CH3mut\_28TM\_41BBz mostrado en el Ejemplo 3 proporcionado en la presente. En aún otra forma de realización, se utiliza un péptidoα CD8. En una forma de realización adicional, el espaciador (por ejemplo, derivado de los dominios de inmunoglobulina descritos en la presente) se puede acoplar al scFv a través de un ligador flexible. Específicamente, un ligador flexible es un ligador de glicina/serina de alrededor de 10-30 aminoácidos (por ejemplo, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, o 5 aminoácidos) y comprende la estructura (Gly4Ser)x, en donde X es 1-5. En otras formas de realización, el ligador de glicina/serina comprende (Gly4Ser)3.

#### IV. Dominio intracelular de señalización

El dominio intracelular de señalización comprende la totalidad de la cadena CD3ζ o parte de esta. CD3ζ, también conocido como CD247, en conjunto con el correceptor de linfocitos T CD4 o CD8 es responsable de acoplar el reconocimiento extracelular del antígeno a las cascadas intracelulares de señalización. En una forma de realización, el CD3ζ utilizado en cualquiera de los constructos proporcionados en la presente es SEQ ID NO: 26.

Además de incluir el dominio de señalización CD3ζ, la inclusión de moléculas coestimuladoras demostró mejorar la actividad de linfocitos T CAR en modelos de murina y en ensayos clínicos. Se investigaron diversos de estos, incluidos CD28, 4-1BB, ICOS, CD27, CD270, CD30 y OX-40. El CAR de la presente invención, además de incluir scFv de KappaMab, ligador flexible, bisagra óptima y cadena CD3ζ también incluye uno o más dominios coestimuladores adicionales de CD28, 4-1BB, ICOS, CD27, CD270, CD30 y/u OX-40, por ejemplo. Estos dominios coestimuladores se seleccionan en función de la funcionalidad deseada del linfocito T CAR resultante. Las combinaciones de ejemplo se muestran, por ejemplo, en las **Figuras 6A-6C**. Además de alterar la longitud de la bisagra extracelular, la inclusión de las combinaciones particulares de los dominios coestimuladores (por ejemplo, CD28, OX-40, 4-1BB) también mejora la proliferación y supervivencia de linfocitos T CAR *in vivo*. En una forma de realización, el CD28 utilizado en cualquiera de los constructos proporcionados en la presente es SEQ ID NO: 25.

#### Coexpresión de moléculas biológicamente activas

Los linfocitos T CAR de la presente invención tienen el beneficio adicional, en comparación con el uso de KappaMab por separado, de modificarse adicionalmente para contener moléculas biológicamente activas adicionales para mejorar la función antitumoral y/o la seguridad de las composiciones. En una forma de realización, los linfocitos T CAR pueden modificarse genéticamente para producir citocinas que permiten la administración focalizada al microentorno tumoral/células cancerosas, a la vez que evita la toxicidad sistémica. Los ejemplos de las moléculas biológicamente activas adicionales que pueden mejorar la respuesta antitumoral de los linfocitos T CAR de la presente invención incluyen, entre otras, IL-12, la proteína de unión de carbohidratos Galectina-3 (GAL3) o su forma truncada, GAL3C, y el súper antagonista receptor de citocina SANT7. En otra forma de realización, los linfocitos T CAR de la presente invención también pueden cotransducirse con un plásmido que expresa una proteína de unión de factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). En una forma de realización, la proteína de factor de crecimiento de hepatocitos es un anticuerpo o un fragmento de este capaz de unirse a HGF y de inhibir la funcionalidad de este.

IL-12 es una citocina de supresión tumoral potente, que disminuye el crecimiento tumoral y la angiogénesis y mejora la respuesta inmunitaria específica del tumor. Las células de mieloma múltiple retienen la expresión del receptor de IL-12 y la administración de IL-12 a ratones portadores de mieloma disminuye la progresión del tumor como agente único y actúa sinérgicamente con el inhibidor del proteasoma bortezomib (Airoldi, et al. (2008) Blood, 112(3):750-759; Wang, et al. (2014) Anticancer Drugs, 25(3): 282-288). La expresión de IL-12 por los linfocitos T CAR mejora drásticamente su capacidad para erradicar tumores sólidos, pero este enfoque aún no se ha investigado en el mieloma múltiple (Pegram, (2012) Blood, 119(18):4133-4141 y Zhang, et al. (2011) Mol. Ther. 19(4):751-759).

SANT7 es un superagonista del receptor de citocinas. Es un análogo de IL-6 que ha sido modificado genéticamente para mejorar 70 veces su unión a la subunidad del receptor de IL-6, prácticamente sin interacción con la subunidad de señalización gp130. SANT7 induce la apoptosis en líneas celulares de mieloma dependientes de IL-6 *in vitro*, supera la resistencia mediada por el estroma a la dexametasona en modelos *in vitro* y murinos y, combinado con inhibidores de NFκB, supera por completo la resistencia a la apoptosis. La IL-6 es una citocina que desempeña un papel en el crecimiento y la supervivencia de una variedad de tumores, incluidos el mieloma múltiple, el cáncer de pulmón, el cáncer colorrectal, el cáncer de mama y otros. La unión de IL-6 a su receptor activa la vía JAK-STAT, con la posterior fosforilación de STAT3 que modula la expresión de genes relacionados con la apoptosis, como BCL-XL y p53, provocando resistencia a la apoptosis. La IL-6

también promueve la regulación negativa del receptor de IL-12 en las células de mieloma, lo que disminuye las propiedades supresoras de tumores de IL-12. (Airoidi, et al. (2008) *Blood*, 112(3):750-759). El receptor de IL-6 está regulado positivamente en el mieloma y los niveles sistémicos elevados de IL-6 se correlacionan con un mal pronóstico. (Rawstron, et al. (2000) *Blood* 96(12) 3880-3886; Ludwig, et al. (1991) *Blood*, 77(12):2794-2795). Se han desarrollado anticuerpos monoclonales contra IL-6 para uso clínico; sin embargo, aunque los primeros ensayos clínicos en mieloma mostraron efectos biológicos mensurables, los anticuerpos parecieron formar complejos con la IL-6 circulante, lo que condujo a una eliminación reducida y limitó potencialmente su eficacia. (Bataille, et al. (1995) *Blood*, 86(2): 685-691). Recientemente, el anticuerpo monoclonal quimérico específico de IL-6 Siltuximab se ha evaluado en ensayos clínicos de fase I y II en mieloma múltiple en recaída y refractario. No hubo respuestas al Siltuximab solo, pero la toxicidad hematológica fue común y más de la mitad experimentó infecciones relacionadas con el tratamiento.

Galectina-3 es una proteína de unión de carbohidratos que puede desempeñar un papel en la adhesión e invasión de tumores. Una forma truncada de Galectina-3, **Ga13C**, actúa como una forma negativa dominante y puede inhibir el crecimiento y la invasión de las células de mieloma. Se diseñó un constructo **Ga13C** para la secreción inducible por activación basándose en John et al (2003) *Clin Cancer Res.*, 9(6):2374-83 y Mirandola et al. (2011) *PLoS One*, 6(7):e21811. Esto consiste en el terminal carboxi de 143 aminoácidos que conserva sus propiedades de unión a carbohidratos, pero carece de los aminoácidos N-terminales necesarios para la reticulación del ligando. El constructo también contiene el péptido líder CD8-alfa para dirigir la secreción y una etiqueta 6xHis para la detección.

Además de los vectores de expresión que contienen el constructo CAR descrito anteriormente, los linfocitos T pueden modificarse adicionalmente con uno o más vectores de expresión que comprenden IL-12, SANT7 y/o GAL3C. Específicamente, los constructos de expresión que expresan una IL-12 monocatenaria que comprende la subunidad p35 de IL-12 unida a la subunidad p40 de IL-12 son particularmente útiles porque la proteína resultante es un heterodímero p70 de IL-12 completamente bioactivo, sin embargo, expresado como un único polipéptido. Por ejemplo, el constructo IL-12 monocatenario, denominado Flexi-12, se describe, por ejemplo, en Anderson, et al. (1997) *Hum. Gene Ther.* 8(9):1125-35 se utiliza. El constructo monocatenario de IL-12 puede expresarse en el mismo vector de expresión que el constructo CAR o puede expresarse en un vector de expresión separado y cotransducirse en el linfocito T. De manera similar, los linfocitos T transducidos con el constructo CAR descrito anteriormente se pueden cotransducir con un vector de expresión adicional que comprende SANT7 y/o GAL3C; alternativamente, se puede usar un vector de expresión para transducir linfocitos T con SANT7 y GAL3C, ya sea solos o en combinación y el constructo CAR descrito anteriormente. Por ejemplo, se pueden usar tres vectores de expresión, uno que expresa el constructo CAR, uno que expresa el constructo IL-12 monocatenario y otro que expresa el constructo SANT7. Puede usarse una estrategia similar para coexpresar GAL3C con IL-12 y/o SANT7. Alternativamente, el constructo IL-12, GAL3C y/o SANT7 se puede expresar mediante un único vector de expresión mientras que el constructo CAR se expresa mediante su propio vector de expresión. Una persona del oficio de nivel medio apreciará las diferentes combinaciones y posibilidades para expresar estas moléculas en el mismo linfocito T.

#### Proteínas de unión al HGF

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y su receptor, MET, se han implicado en el desarrollo y la progresión del cáncer, en particular en la invasión tumoral y la progresión a enfermedad metastásica. Las células de mieloma múltiple expresan tanto HGF como MET, creando así un bucle autocrino y paracrino, mientras que las células plasmáticas normales no expresan HGF (Zhan et al. (2002); Borset, et al. (1996). Además, las concentraciones de HGF aumentan significativamente en la sangre y la médula ósea de pacientes plasmáticos con mieloma múltiple y los niveles altos de HGF en suero se correlacionan con la enfermedad en estadio avanzado y lesiones óseas extensas (Seidel et al. (1998); Wader, et al. (2008); Alexandrakis, et al. (2003). Además, el análisis de biomarcadores séricos de pacientes en un ensayo de fase I con KappaMab muestra una disminución relacionada con la dosis estadísticamente significativa en el HGF sérico después del tratamiento con KappaMab en comparación con el control. Para potenciar esta reducción del HGF sérico, en determinadas formas de realización se expresará una proteína de unión al HGF en los linfocitos T CAR de la presente invención. En una forma de realización particular, la proteína de unión al HGF expresada es un anticuerpo o fragmento de este. En una forma de realización particular, la proteína de unión al anti-HGF es un anticuerpo, un diacuerpo, un scFv o un Fab. En una forma de realización, la proteína de unión al HGF se expresa en el mismo vector de expresión que el constructo CAR. En una forma de realización adicional, la proteína de unión al HGF se expresa en un vector separado pero se cotransduce con el constructo CAR. En aún otra forma de realización, el linfocito T CAR expresa CAR, una proteína de unión al HGF e IL-12. En aún otra forma de realización, el linfocito T CAR expresa CAR, una proteína de unión al HGF y SANT7. En aún otra forma de realización, el linfocito T CAR expresa CAR, una proteína de unión al HGF y GAL3C. En aún otra forma de realización, el linfocito T CAR expresa CAR, una proteína de unión al HGF e IL-12 y GAL3C. En aún otra forma de realización, el linfocito T CAR expresa CAR, una proteína de unión al HGF y SANT7 y GAL3C. En otra forma de realización, el linfocito T CAR expresa CAR, una proteína de unión al anti-HGF, IL-12 y SANT7. En aún otra forma de realización, el linfocito T CAR expresa CAR, una proteína de unión al HGF, IL-12, SANT7 y GAL3C.

## Métodos de producción de linfocitos T CAR de la presente invención

Se proporcionan métodos (pero no se reivindican específicamente) para generar linfocitos T CAR que expresan los CAR descritos en la presente y opcionalmente una o más citocinas antitumorales (por ejemplo, IL-12 y/o SANT7) y/o una o más proteínas de unión al HGF. Una persona del oficio de nivel medio comprenderá fácilmente que, si bien en la presente se describen métodos preferidos para construir vectores de expresión que contienen los CAR y citocinas/anticuerpos antitumorales de la presente invención, cualquier método que sea capaz de transducir linfocitos T para expresar estos constituyentes puede ser usado.

En un ejemplo, los linfocitos T se pueden obtener a partir de la sangre de un sujeto mediante punción venosa, aspiración de médula ósea, leucoféresis en estado estacionario o leucoféresis cebada con citocinas y aislamiento posterior de células mononucleares de sangre periférica, incluidos los linfocitos T, usando separación en gradiente de densidad. En ciertos ejemplos, después de lisar los glóbulos rojos, los linfocitos T se clasifican mediante citometría de flujo o se purifican con el uso de anticuerpos contra antígenos expresados en linfocitos T y perlas magnéticas para obtener una población de linfocitos T puros. En un ejemplo particular, los linfocitos T se clasifican en función de su expresión de CD3 para obtener una fracción de linfocitos T completa. En un ejemplo particular, los linfocitos T se clasifican en función de su expresión de CD4 o CD8 para obtener una población de linfocitos T CD4+ o linfocitos T CD8+. En un ejemplo particular, los linfocitos T se obtienen a partir de un sujeto que necesita el tratamiento de linfocitos T CAR. En otro ejemplo, los linfocitos T se pueden obtener de un sujeto donante que no es el receptor previsto del tratamiento con linfocitos T CAR.

En un ejemplo, los linfocitos T separados se cultivan *in vivo* en condiciones adecuadas para su supervivencia y se transducen con vectores de expresión que contienen las secuencias necesarias para la expresión de los CAR descritos en la presente y/o IL-12, SANT7, GAL3C y/o una proteína de unión al HGF. En un ejemplo, el vector de expresión es un sistema de expresión vectorial transponible. En un ejemplo particular, el vector de expresión es un plásmido de expresión del transposón PiggyBac o un vector viral (por ejemplo, un vector retroviral o un vector lentiviral). En un ejemplo, el plásmido de expresión del transposón PiggyBac es inducible tal como, por ejemplo, el plásmido del transposón PiggyBac descrito en los Ejemplos proporcionados en la presente. En un ejemplo, el plásmido de expresión del transposón PiggyBac comprende un promotor constitutivamente activo y/o un promotor inducible por activación. El promotor constitutivamente activo puede ser un promotor del factor de elongación 1 alfa (EF1alfa). El promotor inducible por activación puede ser un promotor (NFAT pro). En un aspecto, se usa un plásmido de expresión PiggyBac y produce la integración permanente del CAR al cortar y pegar las secuencias codificantes de CAR, IL-12, SANT-7, GAL3C y/o la proteína de unión al HGF en el genoma del linfocito T. En un ejemplo particular, los vectores de expresión comprenden además un marcador detectable que permite la identificación de linfocitos T que se han transducido con éxito con uno o más vectores de expresión. En un ejemplo, el marcador detectable se elige del grupo que consiste en un marcador de superficie celular tal como CD34 o CD20 u otra proteína de superficie, un fluoróforo tal como isotiocianato de fluoresceína o cualquier otro tinte fluorescente que emite luz cuando se excita a un estado de energía superior que incluye mediante un láser, y un casete de resistencia a antibióticos tal como resistencia a kanamicina, resistencia a ampicilina o cualquier otro casete que confiera resistencia a una sustancia antibiótica contenida en el medio en el que se van a cultivar linfocitos T transducidos. En un ejemplo, el marcador detectable es una proteína de fluorescencia verde (GFP). La GFP puede ser una GFP mejorada, tal como, por ejemplo, los constructos mostrados en los Ejemplos proporcionados en la presente. En un ejemplo particular, cada vector de expresión usado (por ejemplo, un vector de expresión que comprende un CAR, y uno que comprende IL-12, GAL3C y/o SANT-7 y uno que comprende una proteína de unión al HGF) comprende un marcador detectable único. En un ejemplo, los vectores de expresión se transducen en el linfocito T mediante un método adecuado para los vectores de expresión seleccionados. En un ejemplo, el vector de expresión PiggyBac se transduce en linfocitos T mediante electroporación.

Después de la introducción de los vectores de expresión apropiados, los linfocitos T pueden cultivarse y expandirse *in vitro* mediante cocultivo con células mononucleares de sangre periférica (PBMC) autólogas y los factores de crecimiento apropiados y examinarse adicionalmente para determinar la presencia de uno o más marcadores detectables. A continuación, se pueden clasificar y purificar los linfocitos T que expresan los marcadores detectables apropiados para los vectores de expresión elegidos.

Linfocitos T modificados genéticamente para su uso en métodos de tratamiento de neoplasias malignas que expresan KMA

En un aspecto, la invención proporciona linfocitos T modificados genéticamente para expresar receptores del antígeno quimérico (CAR), en donde cada CAR comprende uno o más dominios intracelulares de señalización y un dominio extracelular de unión al antígeno, en donde el dominio extracelular de unión al antígeno comprende un fragmento variable monocatenario (scFv) que une específicamente KMA, en donde el scFv comprende regiones que determinan complementariedad (CDR) derivadas de un anticuerpo monoclonal Kappa (KappaMab), en donde las CDR KappaMab comprenden SEQ ID NO: 3-8, para su uso en un método para tratar una

malignidad que expresa KMA en un sujeto. En un aspecto particular, el sujeto que lo necesita es un sujeto humano al que se le ha diagnosticado o se sospecha que tiene una enfermedad maligna que expresa KMA, por ejemplo, una enfermedad maligna de linfocitos B que expresa KMA. En ciertas formas de realización, un paciente tiene o se sospecha que tiene mieloma múltiple (MM), macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL) o amiloidosis. Los métodos para diagnosticar neoplasias malignas de linfocitos B que expresan KMA, por ejemplo, mieloma múltiple (MM), macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL) y amiloidosis, se conocen en la técnica y, como tales, no se describen en detalle en la presente. Los linfocitos T CAR se pueden usar solos o en combinación con otros agentes terapéuticamente eficaces para el tratamiento de la macroglobulinemia de Waldenstrom del mieloma múltiple (MM), el linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL), la amiloidosis u otra neoplasia maligna de linfocitos B que exprese KMA. En ciertos aspectos, los linfocitos T CAR de la presente invención se administran en una formulación farmacéutica adecuada para administración intravenosa.

En ciertos aspectos, los linfocitos T CAR de la presente invención se administran antes, durante o después de uno o más fármacos inmunomoduladores. En un aspecto particular, uno o más fármacos inmunomoduladores es talidomida o un análogo de talidomida tal como, por ejemplo, lenolidomida o pomalidomida.

En ciertos aspectos de la invención, los linfocitos T CAR de la presente invención actúan sinérgicamente cuando se administran con uno o más fármacos inmunomoduladores.

En una forma de realización adicional, los linfocitos T CAR de la presente invención se administran antes, durante o después del tratamiento con uno o más inhibidores de histona desacetilasa tales como panobinostat, vorinostat, tricostatina A, depsipéptidos, fenilbutirato, ácido valproico, belinostat, LAQ824, entinostat, CI944 o mocetinostat.

En ciertos aspectos de la invención, los linfocitos T CAR de la presente invención actúan sinérgicamente cuando se administran en combinación con uno o más inhibidores de histona desacetilasa.

En ciertos aspectos de la invención, los linfocitos T CAR de la presente invención actúan sinérgicamente cuando se administran en combinación con quimioterapia de dosis intermedia o alta y después de la administración de células madre sanguíneas humanas autólogas o alogénicas.

En una forma de realización, los linfocitos T de la presente invención se administran antes, durante o después de un trasplante alogénico de célula madre. En aún otra forma de realización, los linfocitos T de la presente invención se administran antes, durante o después de un trasplante alogénico de célula madre. Sin estar ligado a ninguna teoría, los linfocitos T CAR de la presente invención, cuando se administran en combinación con un autotrasplante de células madre o alogénico previenen la aparición de enfermedad residual mínima que puede ocurrir por la ablación incompleta de la médula ósea antes del trasplante de células madre o por resurgimiento de clones de linfocitos B malignos que expresan KMA.

## EJEMPLOS

La invención se describe con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos experimentales.

### EJEMPLO 1: Generación de KMA.CAR-28z

En función de la secuencia de nucleótidos que codifica las regiones variables de KappaMab (SEQ ID NOS: 9 y 10), se diseñó y clonó un scFv en un constructo CAR que contiene una bisagra de la cadena pesada de inmunoglobulina, un dominio coestimulador de CD28 y el endodominio de CD3-zeta (**Figura 6A**). El constructo se diseñó en Clone Manager 9 (Sci-Ed Software) mediante el uso de la secuencia genética de las regiones variables del anticuerpo proporcionada por Haemalogix Pty Ltd. La secuencia de aminoácidos de 5' a 3' de las porciones de este constructo (es decir, KM.CAR-hCH2CH3-28z; Figura 6A) son los siguientes:

El péptido líder de la cadena pesada de Ig (Uniprot P01764) es MEFGLSWLFLVAILKGVQCSR (SEQ ID NO: 20).

La región variable de la cadena liviana del anticuerpo KappaMab es

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALIYSTSYRYS  
GVPDRFTGSGSGTDFLTISNVQSEDLAEYFCQQYNSYPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID  
NO: 21).

La región variable de la cadena pesada es

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHVVKQRPEQGLEWIGRIDPANG  
NTKYDPKFQGKATIIADTSSNTAYLQLSSLTSEDYAVYYCARGVYHDYDGDYWGQG  
TTLTVSSYVTVSS (SEQ ID NO: 22).

El ligador flexible (G4S)<sub>3</sub> es GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 23).

5

Los dominios bisagra, CH2 y CH3 de la región constante de IgG1 con una mutación C>P en la región bisagra en la posición del aminoácido 103 (Uniprot P01857) son

YVTVSSQDPAEPKSPDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV  
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD  
IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEAL  
HNHYTQKSLSLSPGKKDPK (SEQ ID NO: 24).

10

Los dominios transmembrana e intracelular de CD28 (Uniprot P10747) son

FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYP  
YAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO: 25).

15

El dominio intracelular de CD3 zeta humano (Uniprot P20693) es

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ  
EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP  
PR (SEQ ID NO: 26).

20

La secuencia de aminoácidos de longitud completa como sigue es

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSRDIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVA  
WYQQKPGQSPKALIYSTSYRYSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQY  
NSYPYTFGGGTKEIKGGGSGGGGSGGGGSEVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTAS  
GFNIKDTYMHVVKQRPEQGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFQGKATIIADTSSNTAYLQ  
LSSLTSEDYAVYYCARGVYHDYDGDYWGQGTTLTVSSYVTVSSQDPAEPKSPDKT  
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG  
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS  
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT  
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKKDP  
KFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYP  
PYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD  
PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATK  
DTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 27).

Esta secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 27) está codificada por la siguiente secuencia de ADN:

25

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTC  
CAGTGCTCTAGAGACATCGTCATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAG  
TAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTAATG  
TAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACTGATTTACTCGAC  
ATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACA  
GATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTTCT  
GTCAGCAATATAACAGCTATCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAAA  
TAAAGGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGCGGTGGCGGCGGATCTGAGG  
TGCAGCTGCAGCAGTCAGGGGCGGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAGTCAAGT  
TGTCTGTACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACACCTATATGCACTGGGTGAA

GCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTGCGAATGG  
 TAACACTAAATATGACCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAATAGCAGACAC  
 ATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCC  
 GTCTATTACTGTGCTAGGGGGGTCTACCATGATTACGACGGGGACTACTGGGGCC  
 AAGGGACCACGCTCACCGTCTCCTCCTACGTCACCGTCTCTTCACAGGATCCCCG  
 CGAGCCCAAATCTCCTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGA  
 ACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTC  
 ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAA  
 GACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC  
 AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC  
 CTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTC  
 TCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGG  
 CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACC  
 AAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC  
 GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAACCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCC  
 TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAC  
 AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT  
 CTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAAAAGAT  
 CCCAAATTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGC  
 TAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCT  
 GCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCCCACCCGCAAGCA  
 TTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAG  
 TTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTAT  
 AACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGT  
 GGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGG  
 CCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGG  
 GATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCT  
 CAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCT  
 CGC (SEQ ID NO: 28).

En términos de construcción de este constructo, se sintetizó una secuencia genética que consiste en un sitio de enzima de restricción EcoRI 5', una secuencia Kozak 5', un péptido líder, un fragmento variable monocatenario y una porción de la región constante de IgG1 que incorpora un sitio de enzima de restricción AleI por GeneArt (ThermoFisher Scientific), secuencia verificada y luego clonada en el plásmido de expresión del transposón pRIL-CAR.CD19-28z PiggyBac. Luego se introdujo en linfocitos T de donantes de 2 donantes normales mediante coelectroporación con el plásmido de la transposasa PiggyBac para mediar en una integración estable. El sistema del transposón/transposasa PiggyBac produce una integración permanente del CAR al cortar y pegar el gen de interés en el genoma de la célula diana. Se eligió el sistema de expresión PiggyBac porque es capaz de producir altos niveles de modificación genética permanente a una fracción del costo de los vectores retrovirales. Sin embargo, una persona del oficio de nivel medio entenderá que también podrían usarse otros sistemas de



expresión, incluidos vectores retrovirales.

Los linfocitos T que expresan KM.CAR-hCH2CH3-28z se expandieron de acuerdo con nuestros protocolos optimizados mediante el cocultivo con células alimentadoras mononucleares de sangre periférica (PBMC) autólogas suplementadas con interleucina-15 (IL-15) 10 ng/ml. Después de cultivar durante 3 semanas con reemplazo de PBMC semanalmente y reposición de IL-15 dos o tres veces por semana, se recolectaron linfocitos T y se evaluaron el fenotipo y la expresión de CAR mediante citometría de flujo, la función específica de KMA mediante citometría de flujo de citocinas intracelulares de interferón gamma en estimulación con líneas celulares KMA+ y KMA (**Figura 4A**) y la citotoxicidad de las mismas líneas celulares en un ensayo de liberación de cromo.

Al final de 3 semanas, los cultivos eran predominantemente CAR que expresaban linfocitos T CD3+ (55 % y 70 % de las células vivas), expresaban interferón gamma en respuesta a mieloma KMA+ y líneas de linfocitos B (**Figura 4B**) y demostraban citotoxicidad específica de KMA (**Figura 4C**).

#### Ejemplo 2: Establecimiento de un modelo murino de xenoinjerto de mieloma humano.

Se estableció un modelo de xenotrasplante de mieloma múltiple de humano a ratón. Se inocularon RPMI8226 o líneas celulares de mieloma alternativas por vía i.v. en ratones Rag2-/-yc-/(BALB/c) para formar el modelo Rag MM (**Figura 5A-5D**). Los ratones Rag2-/-yc-/(BALB/c) carecen de linfocitos de ratón (linfocitos T, B y NK) y son huéspedes receptivos para estudios de xenoinjertos humanos. Este modelo se ha utilizado con éxito para probar nuevos tratamientos como bortezomib en combinación con un nuevo anticuerpo (**Figura 5E**). Se utilizará este modelo MM para probar y optimizar aún más los linfocitos T KMA.CAR.

#### Ejemplo 3: Constructos KMA.CAR optimizados

En función del constructo descrito en el Ejemplo 1, 6 constructos CAR que contienen el KM scFv descrito en el Ejemplo 1 con regiones espaciadoras de longitud variable y endodominios coestimuladores (por ejemplo, CD28 o 4-1BB (CD137-Uniport Q07011)) con el endodominio zeta CD3 se construyeron (**Figura 2 y Figuras 6B-6D**). La variación de la longitud del espaciador alteró la distancia entre el linfocito T y la célula diana, con un espaciador más corto de modo que mejora potencialmente la lisis de la célula diana. En todos los constructos, se utilizó el dominio transmembrana CD28 para garantizar la expresión estable de los KMA.CAR en la superficie de los linfocitos T. En todos los casos en los que se usaron componentes de la región constante de la cadena pesada de IgG1 como espaciador, se colocó un segundo ligador flexible (G4S)3 entre el scFv y la región espaciadora. Estos CAR se sintetizaron comercialmente mediante genscript y se clonaron en un plásmido del transposón PiggyBac pVAX1PB para su posterior ensayo.

3 de las 6 constructos KM.CAR contenían un endodominio coestimulador CD28 y eran los siguientes:

El primer constructo de este grupo fue el constructo KM.CAR\_hCH3\_28z, que contiene sólo los dominios bisagra y CH3 de la región constante de la cadena pesada de IgG1 como espaciador y cuya secuencia de ácido nucleico es la siguiente:

```

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTC
CAGTGCTCTAGAGACATCGTCATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATC
AGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTAC
TAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACTGATT
TACTCGACATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGT
GGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAGACT
TGGCAGAGTATTTCTGTCTAGCAATATAACAGCTATCCGTACACGTTCCGGAGG
GGGGACCAAGCTGGAAATAAAGGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGG
GGTGGCGGGCGGATCTGAGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGGGCGGAGCTTGTGAAGCC
AGGGGCGCTCAGTCAAGTTGTCTGTACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACACCTATA
TGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATC
CTGCGAATGGTAACACTAAATATGACCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAATAGC
AGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACT
GCCGTCTATTACTGTGCTAGGGGGGTCTACCATGATTACGACGGGGACTACTGGGGC
CAAGGGACCCAGCTACCGCTCTCCTCCGGTGGAGGGCGGGTCTGGGGGCGGAGGTT
CAGGGCGGGGGTGGTTCCGAGGCCAAATCTCCTGACAAACTCACACATGCCC
AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGA
GCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC
CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTA
CAAGACCACGCCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGC
AAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCC
CTGTCTCCGGGTAAATTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCCTGGCTTGGT

```

*ATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGC  
 AGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCCGGGCCCCACCC  
 GCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGA  
 GTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACAGCT  
 CTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGT  
 GGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCT  
 GTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAA  
 GGCGAGCGCCGGAGGGGGCAAGGGGACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGC  
 CACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC* (SEQ ID  
 NO: 29).

- 5 De 5' a 3', este constructo (SEQ ID NO: 29) tiene un péptido líder, una **región variable de la cadena liviana de KappaMab**, un **ligador (G4S)<sub>3</sub>**, una **región variable de la cadena pesada de KappaMab**, un segundo ligador (G4S)<sub>3</sub>, una **bisagra de IgG1** y **dominios de región constante CH3**, un **dominio transmembrana e intracelular de CD28** y un **dominio intracelular zeta de CD3**. Un diagrama del constructo se muestra en la Figura 6B.
- 10 El segundo constructo de este grupo es el constructo KM.CAR\_h\_28z, que contiene sólo el dominio bisagra de la región constante de la cadena pesada de IgG1 como espaciador, y cuya secuencia de ácido nucleico es la siguiente:

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTC  
 CAGTGCTCTAGAGACATCGTCATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATC  
 AGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTAC  
 TAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACTGATT  
 TACTCGACATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGT  
 GGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAGACT  
 TGGCAGAGTATTTCTGTCAGCAATATAACAGCTATCCGTACACGTTCCGGAGG  
 GGGGACCAAGCTGGAAATAAAGGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTCCG  
 GGTGGCGGCGGATCTGAGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGGGCGGAGCTTGTGAAGCC  
 AGGGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTGTACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACACCTATA  
 TGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATC  
 CTGCGAATGGTAACACTAAATATGACCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAATAGC  
 AGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACT  
 GCCGTCTATTACTGTGCTAGGGGGGTCTACCATGATTACGACGGGGACTACTGGGGC  
 CAAGGGACCACGCTCACCGTCTCCTCCGGTGGAGGCGGGTCTGGGGGCGGAGGTT  
 15 CAGGCGGGGGTGGTTCCGAGCCCAAATCTCCTGACAAAACCTCACACATGCCCA

TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAAC  
 AGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTG  
 ACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCC  
 TATGCCCCACCACGCGACTTCGCGAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAG  
CGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCT  
AGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGAT  
GGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAA  
AGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGG  
GCAAGGGGCACGATGGCCTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACG  
ACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO: 30).

De 5' a 3', este constructo (SEQ ID NO: 30) tiene un péptido líder, una **región variable de la cadena liviana de KappaMab**, un **ligador (G4S)<sub>3</sub>**, una **región variable de la cadena pesada de KappaMab**, un segundo ligador (G4S)<sub>3</sub>, **un dominio de región constante bisagra de IgG1**, **un dominio transmembrana e intracelular de CD28** y un dominio intracelular zeta de CD3. Un diagrama del constructo se muestra en la Figura 6B.

El tercera constructo de este grupo fue el constructo KM.CAR\_CD8a\_28z, que contiene un tallo alfa CD8 (Uniprot P01732, aminoácidos 138-182) como espaciador, y cuya secuencia nucleica es la siguiente:

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGG  
 TGTCCAGTGCTCTAGAGACATCGTCATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCA  
 CATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGG  
 GTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACT  
 GATTTACTCGACATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGC  
 AGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAG  
 ACTTGGCAGAGTATTTCTGTGTCAGCAATATAACAGCTATCCGTACACGTTCCGG  
 AGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAGGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGG  
TCGGGTGGCGGCGGATCTGAGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGGGCGGAGCTTGTGAA  
GCCAGGGGGCCTCAGTCAAGTTGTCTGTACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACACC  
TATATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATT  
GATCCTGCGAATGGTAACACTAAATATGACCCGAAGTTCAGGGCAAGGCCACTATAA  
TAGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGA  
CACTGCCGTCTATTACTGTGCTAGGGGGGTCTACCATGATTACGACGGGGACTACTGG  
GGCCAAGGGACCACGCTCACCGTCTCCTCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCA  
CCAACACCGGCGGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAG

GCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGACACGAGGGGGGCTGGACTT  
CGCCTGTGATTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGC  
TTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCT  
CCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAG  
CATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAA  
GTTGAGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAA  
CGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCG  
GGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAA  
TGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCCA  
GCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCA  
AGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO: 31).

De 5' a 3', este constructo (SEQ ID NO: 31) tiene un péptido líder, una **región variable de la cadena liviana de KappaMab**, un **ligador (G4S)<sub>3</sub>**, una **región variable de la cadena pesada de KappaMab**, un **tallo CDS alfa**, un **dominio transmembrana e intracelular de CD28** y un **dominio intracelular zeta de CD3**.

Los 3 constructos restantes de los 6 constructos KM.CAR descritos en este ejemplo contenían un endodominio coestimulador de 4-1BB (CD137) y eran los siguientes:

El primer constructo de este grupo es KM.CAR\_h\_28TM\_41BBz, que contiene sólo el dominio bisagra de la región constante de la cadena pesada de IgG1 como espaciador y reemplaza el dominio intracelular de CD28 con el dominio intracelular de la molécula coestimuladora 4-1BB, y cuya secuencia de ácidos nucleicos es la siguiente:

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGG  
 TGTCCAGTGCTCTAGAGACATCGTCATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCA  
 CATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGG  
 GTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACT  
 GATTTACTCGACATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGC  
 AGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAG  
 ACTTGGCAGAGTATTTCTGTCAGCAATATAACAGCTATCCGTACACGTTCCG  
 AGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAGGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGG  
TCGGGTGGCGGCGGATCTGAGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGGGCGGAGCTTGTGAA  
GCCAGGGGCTCAGTCAAGTTGTCCTGTACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACACC  
TATAIGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATT  
GATCCTGCCAATGGTAACACTAAATATGACCCGAAGTTCAGGGCAAGGCCACTATAA

TAGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGA  
CACTGCCGTCTATTACTGTGCTAGGGGGGTCTACCATGATTACGACGGGGACTACTGG  
GGCCAAGGGACCACGCTCACCGTCTCCTCCGGTGGAGGCGGGTCTGGGGGCGGAG  
GTTTCAGGCGGGGGTGGTTCCGAGCCCAAATCTCCTGACAAAACCTCACACATGC  
CCATTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGT  
AACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATA  
TATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGT  
AGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAG  
CAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACAGCAGGGGCCAGAACCTCTATAACGAGCT  
CAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCC  
TGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACT  
GCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCG  
GAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACAC  
CTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO: 32).

De 5' a 3', este constructo (SEQ ID NO: 32) tiene un péptido líder, una **región variable de la cadena liviana de KappaMab**, un **ligador (G4S)<sub>3</sub>**, una **región variable de la cadena pesada de KappaMab**, un segundo ligador (G4S)<sub>3</sub>, **un dominio de región constante bisagra de IgG**, **un dominio transmembrana de CD28**, **un dominio transmembrana intracelular de 4-1BB**, y un dominio intracelular zeta de CD3.

El segundo constructo de este grupo fue KM.CAR\_8a\_28TM\_41BBz, que contiene el tallo alfa de CD8 (Uniprot P01732, aminoácidos 138-182) como espaciador y reemplaza el dominio intracelular de CD28 con el dominio intracelular de la molécula coestimuladora de 4-1BB, y cuya secuencia nucleica es la siguiente:

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGG  
 TGTCCAGTGCTCTAGAGACATCGTCATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCA  
 CATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGG  
 GTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACT  
 GATTTACTCGACATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGC  
 AGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAG  
 ACTTGGCAGAGTATTTCTGTCAGCAATATAACAGCTATCCGTACACGTTCCG  
 AGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAGGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGG  
 TCGGGTGGCGGCGGATCTGAGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGGGCGGAGCTTGTGAA  
 GCCAGGGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTGTACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACACC  
 TATATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATT

GATCCTGCGAATGGTAACACTAAATATGACCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAA  
 TAGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGA  
 CACTGCCGTCTATTACTGTGCTAGGGGGGTCTACCATGATTACGACGGGGACTACTGG  
 GGCCAAGGGACCACGCTCACCGTCTCCTCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCA  
CCAACACCGGCGCCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAG  
GCGTGCCGGCCAGCGGGCGGGGGGCGCAGTGACACGAGGGGGGCTGGACTT  
CGCCTGTGATTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGC  
TTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAAACGGGGCAGAAAGAAACT  
CCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAG  
ATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGT  
GAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTA  
TAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGC  
CGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTA  
CAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGC  
GAGCGCCGGAGGGGGCAAGGGGACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCAC  
CAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO: 33).

De 5' a 3', este constructo (SEQ ID NO: 33) tiene un péptido líder, una **región variable de la cadena liviana de KappaMab**, un **ligador (G4S)<sub>3</sub>**, una **región variable de la cadena pesada de KappaMab**, un **tallo CDS alfa**, un **dominio transmembrana de CD28**, un **dominio intracelular de 4-1BB** y un **dominio intracelular zeta de CD3**.

El tercer constructo de este grupo es KM.CAR\_hCH2CH3mut\_28TM\_41BBz, que contiene los dominios bisagra, CH2 y CH3 de la región constante de la cadena pesada de IgG1 como espaciador, con mutaciones introducidas en aminoácidos importantes para la interacción de CH2 con los receptores Fc (3-6) que puede mediar la reducción de la supervivencia de los linfocitos T CAR *in vivo* (3, 6, 7) mediante la eliminación de los linfocitos T CAR en el sistema reticuloendotelial. La secuencia de ácido nucleico es la siguiente:

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGG  
 TGTCCAGTGCTCTAGAGACATCGTCATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCA  
 CATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGG  
 GTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACT  
 GATTTACTCGACATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGC  
 AGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAG  
 ACTTGGCAGAGTATTTCTGTCAGCAATATAACAGCTATCCGTACACGTTTCGG  
 AGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAGGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGG  
TCGGGTGGCGGCGGATCTGAGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGGGCGGAGCTTGTGAA

GCCAGGGGCTCAGTCAAGTTGTCCTGTACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACACC  
 TATATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATT  
 GATCCTGCGAATGGTAACACTAAATATGACCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAA  
 TAGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGA  
 CACTGCCGTCTATTACTGTGCTAGGGGGGTCTACCATGATTACGACGGGGACTACTGG  
 GGCCAAGGGACCACGCTCACCGTCTCCTCCGGTGGAGGCGGGTCTGGGGGCGGAG  
 GTTCAGGCGGGGGTGGTTCCGAGCCCAAATCTCCTGACAAAACCTCACACATGC  
 CCACCGTGCCCAGCACCTCCAGTGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC  
 CAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCGCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCG  
 TGGTGGTGAACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG  
 TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG  
 TACGCCAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGAC  
 TGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCA  
 GCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA  
 CAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTC  
 AGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG  
 TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTG  
 CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGA  
 GCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC  
 TGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATTTTG  
 GGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGG  
 CCTTTATTATTTTCTGGGTGAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAA  
 CAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCC  
 ATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCG  
 CAGACGCCCCCGCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAG  
 GACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGG  
 GGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAG  
 ATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGC  
 AAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGAC  
 GCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO: 34).

De 5' a 3', este constructo (SEQ ID NO: 34) tiene un péptido líder, una **región variable de la cadena liviana de KappaMab**, un **ligador (G4S)<sub>3</sub>**, una **región variable de la cadena pesada de KappaMab**, un **segundo ligador (G4S)<sub>3</sub>**, una **bisagra de IgG1 mutada**, **dominios de la región constante de CH2 y CH3**, un **dominio transmembrana de CD28**, un **dominio intracelular de 4-1BB**, y un **dominio intracelular zeta de CD3**. El dominio bisagra de IgG1 mutado tiene, de 5' a 3', las mutaciones E233P, L234V, L235A, G236-, S254A, D265N y N297A resaltadas dentro de los cuadros sombreados de este constructo (SEQ ID NO: 34). Las mutaciones en estos sitios (E233P, L234V, L235A, G236-, S254A, D265N, N297A) pueden disminuir la interacción de Fc con los linfocitos T CAR, lo que permite mejorar la supervivencia después de la infusión.

### Adición del elemento de salto ribosomal 2A y eGFP a KM.CAR

Para facilitar la detección de los linfocitos T que expresan cada uno de los CAR descritos anteriormente, se sintetizó una eGFP con un elemento de salto ribosomal 5' T2A con secuencias superpuestas con el endodominio zeta CAR-CD3 y la cadena principal del plásmido. Luego se clonó mediante digestión con enzimas de restricción y ligación en el CAR que contenía plásmidos de transposones pVAX1 PB para crear lo siguiente:

#### Constructos que contienen 28z Endodomain\_2A\_GFP:

1. pVAX1PB KM.CAR\_hCH2CH3\_28z\_2A\_GFP
2. pVAX1PB KM.CAR\_hCH3\_28z\_2A\_GFP
3. pVAX1PB KM.CAR\_h\_28z\_2A\_GFP
4. pVAX1PB KM.CAR\_8a\_28z\_2A\_GFP

#### Constructos que contienen 41BBz Endodomain\_2A\_GFP:

1. pVAX1PB KM.CAR\_h\_28TM\_41BBz\_2A\_GFP
2. pVAX1PB KM.CAR\_8a\_28TM\_41BBz\_2A\_GFP
3. pVAX1PB KM.CAR\_hCH2CH3mut\_28TM\_41BBz\_2A\_GFP
- 4.

#### Generación de linfocitos T KM.CAR con dominio coestimulador de 4-1BB.

Se realizó una comparación entre el KM.CAR\_hCH2CH3\_28z preliminar y los CAR que contienen 4-1BB. Los linfocitos T KM.CAR se generaron mediante electroporación utilizando el sistema PiggyBac como se describió anteriormente en la presente y en el estado de la técnica (2). Se electroporaron cuatro millones de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos con el sistema de electroporación Neon a 2400 V durante 20 ms, pulso único, en presencia de 5 ug de cada uno de los plásmidos de PiggyBac transposasa y PiggyBac Transposon. Los constructos KMA.CAR probados incluyeron KM.CAR\_hCH2CH3\_28z\_2A\_GFP; KM.CAR\_h\_28TM\_41BBz\_2A\_GFP; KM.CAR\_8a\_28TM\_41BBz\_2A\_GFP; o KM.CAR\_hCH2CH3mut\_28TM\_41BBz\_2A\_GFP.

Las PBMC electroporadas (CAR-PBMC) se dejaron reposar durante la noche en AIMV con suero fetal de ternera al 10 % (AIM-V CM), se recogieron, se lavaron y se resuspendieron en AIM-V CM a 13106/ml. Las CAR-PBMC se cocultivaron con células alimentadoras de PBMC autólogas irradiadas con o sin KMA irradiada que expresaba células JJN3 en una relación CAR-PBMC:JJN3 de 5:1. Se agregó interleucina-15 (IL-15) a 10 ng/ml cada 3 días. Las células se enumeraron mediante exclusión con azul tripán y se agregaron células estimuladoras/alimentadoras recién irradiadas cada 7 días.

#### Evaluación de la expresión KM.CAR

La expresión de KM.CAR se evaluó mediante citometría de flujo al inicio del cultivo (día 1), día 15 y día 21 (**Figuras 8A-8B**). Los cultivos de linfocitos T KM.CAR se tiñeron en la superficie con anticuerpo anti-CD3 humano y la expresión de CAR se evaluó mediante la expresión de GFP.

#### Los linfocitos T KM.CAR requieren que el antígeno de mieloma kappa persista *in vitro*

Los cultivos que contienen la línea celular JJN3 que expresa KMA mostraron una mayor expansión total, una mayor expresión de KM.CAR o ambas, en comparación con los cultivos con PBMC solas (**Figuras 8A-8B**). De acuerdo con la interacción conocida del dominio de CH2 de la región constante de IgG con los receptores Fc, los linfocitos T que expresan KM.CAR\_hCH2CH3\_28z se enriquecieron en presencia de PBMC solas (2 % de los linfocitos T CD3+), pero mostraron una mayor expansión y enriquecimiento con adición de células JJN3 (expansión de 15 veces con 38 % de expresión de CAR en comparación con expansión de 6 veces con 29 % de expresión de CAR).

Los linfocitos T que expresan KM.CAR\_hCH2CH3mut\_28TM\_41BBz mostraron solo un nivel bajo de expresión de CAR (6 %) y expansión (6 veces) con PBMC solas en comparación con el cocultivo con JJN3 (26 % de expresión de CAR y expansión de 17 veces). Los linfocitos T KM.CAR que contienen solo el espaciador de bisagra de IgG1 tuvieron una expansión similar (5 veces con JJN3, 6 veces sin JJN3) pero aumentaron la expresión de CAR (17 % con JJN3, 9 % sin). Sólo los linfocitos T KM.CAR que contienen el espaciador de cadena alfa CD8 no mostraron ninguna expansión o enriquecimiento mejorado en presencia de células JJN3 (expansión de 8 veces y 5 % de expresión de CAR en presencia de JJN3, en comparación con una expansión de 5 veces y 5 % expresión CAR sin JJN3).

#### Evaluación funcional de los linfocitos T KM.CAR

La producción de interferón gamma específica de KMA y la citotoxicidad de los linfocitos T KM.CAR se evaluaron mediante citometría de flujo de citocinas intracelulares y un ensayo de liberación de cromo estándar con líneas celulares KMA+ y KMA mediante el uso de protocolos descritos previamente (2). Las líneas celulares positivas



para KMA incluyeron JJN3, Pfeiffer, NCI-H929. Las líneas celulares negativas para KMA incluyeron Nalm 6 y Molt (**Figura 12A-12B**).

- 5 Para la citometría de flujo de citocinas, se estimularon linfocitos T KM.CAR 23105 con células diana en una proporción de 1:1 durante 5 horas. Se agregaron monensina (2 mM) (BD Biosciences) y Brefeldin A (1 mg/ml) (BD Biosciences) después de 1 hora. Los linfocitos T CAR activados de forma no específica con 50 ng/ml de acetato de miristato de forbol (PMA: Sigma-Aldrich) y 1 ug/ml de ionomicina (Sigma-Aldrich) y células no estimuladas se utilizaron como controles positivos y negativos. Luego se recolectaron los linfocitos T CAR, se lavaron y se tiñeron la superficie para CD3, CD4 y CD8. Los linfocitos T CAR se fijaron y permeabilizaron con
- 10 cytofix y amortiguador de lavado/permanencia (BD Biosciences) y se tiñeron con anticuerpo anti-interferón gamma (BD Biosciences) seguido de un lavado adicional con amortiguado de lavado/permanencia. Las células teñidas se analizaron mediante el uso de un citómetro de flujo FACSCanto™ II con adquisición de al menos 30.000 eventos.
- 15 La citotoxicidad específica de KMA se evaluó mediante un ensayo de liberación de cromo (51Cr) estándar. Las células diana se etiquetaron con cromato de sodio (Na 51 CrO) (Perkin-Elmer, Waltham, MA, EE. UU.). Los linfocitos T KM.CAR se preincubaron con la línea celular K562 en una proporción de 1:1 para absorber la actividad de las células NK. Se agregaron células diana etiquetadas con cromo a los linfocitos T KM.CAR por triplicado en proporciones efector:diana que oscilaban entre 40:1 y 1,25:1 y se incubaron a 37 °C, 5 % de CO2
- 20 durante 4 horas.
- Se lisaron dianas por triplicado con dodecilsulfato de sodio al 10 % para determinar la liberación máxima y se utilizaron dianas por triplicado sin efectores para evaluar la liberación espontánea. Los sobrenadantes se aspiraron y leyeron mediante el uso de un contador de placas MicroBeta2 (PerkinElmer). El porcentaje de lisis específica se calculó utilizando la fórmula estándar: % de lisis específica = (liberación de prueba - liberación espontánea) / (liberación máxima - liberación espontánea) x 100]
- 25

Ejemplo 4: Generación del plásmido de transposón PiggyBac con el promotor de activación inducible

- 30 Se diseñó y clonó un único casete de transposón que contiene un promotor constitutivamente activo (EF1alfa) y un promotor inducible por activación (NFATpro). El casete de expresión génica inducible por activación se produjo mediante el diseño de NFATpro utilizando Clone Manager 9 (Sci-Ed Software), basado en Fiering et al(8). Esto incluye 6 copias de la secuencia de ADN de 30 pares de bases (elemento de respuesta RE) unida por el factor nuclear de linfocitos T activados (NFAT-RE) GGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGT (SEQ ID NO:
- 35 35) seguido por el promotor mínimo de IL-2 ACATTTTGACACCCCATATAATTTTTCCAGAAATTAACAGTATAAATTGCATCTCT TGTTCAAGAGTTCCCTATCACTCTCTTTAATCACTACTCACAGTAACCTC AACTCC TG (SEQ ID NO: 36) encontrado en cromosoma 4 (Secuencia de referencia NCBI: NG\_016779.1).
- 40 Para permitir la detección de la expresión génica inducida por activación, la secuencia de ADN de la proteína fluorescente verde mejorada (eGFP) seguida de la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (BGH) (9-11) se colocó en 3' del NFATpro. La secuencia de ADN de este casete genético es la siguiente:

GGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCAATTAGGAGGAAAA  
ACTGTTTCATACAGAAGGCGTCAATTAGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGG  
CGTCAATTGTCCCATCGAATTAGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCA  
ATTAGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCAATTAGGAGGAAAACTGT  
TTCATACAGAAGGCGTCAATTGTCCCGGGACATTTTGACACCCCCATAATATTT  
TTCCAGAATTAACAGTATAAATTGCATCTCTTGTTCAGAGTTCCTTATCACT  
CTCTTTAATCACTACTCACAGTAACCTCAACTCCTGAACTCCATGGATGGTGAG  
CAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCG  
ACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTAC  
GGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCC  
ACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCAC  
ATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCAAGGCTACGTCCAGGAGCGC  
ACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAG  
GGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGC  
AACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGG  
CCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGA  
CGGCAGCGTGACGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGATCCGGAG  
CCACGAACCTTCTCTCTGTAAAGCAAGCAGGAGACGTTGAAGAAAACCCCGGTC  
CTATTTAAATCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCC  
CTCCCCCGTGCTTCCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTTTTCC  
TAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTC  
TGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAAT  
AGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGC (SEQ ID NO: 37).

De 5' a 3', este constructo contiene NFAT-RE, el promotor mínimo de IL-2, eGFP y la señal de poliadenilación de BGH.

Este casete fue sintetizado comercialmente por Genscript y clonado en el plásmido de transposón pVAX1PB entre el aislante 5' cHS4 (GenBank: U78775.2)(12) y el promotor del factor 1 de elongación humano. Para identificar los linfocitos T transducidos en experimentos iniciales, se clonó el marcador quimérico RQR8 que consiste en el epítipo de CD34 reconocido por el anticuerpo monoclonal QBEnd10 y mimotopos del anticuerpo monoclonal específico de CD20 Rituximab(13) en el sitio de multiclonaje de transposones para producir el inserto génico de transposones mostrado en la **Figura 9** (plásmido pVAX1PB NFATGFP-RQR8). La coelectroporación del casete del gen inducible por activación que contiene el plásmido de transposón pVAX1PB NFATGFP-RQR8 y el plásmido de transposasa pVAX1 PBase conduce a la integración permanente del inserto del gen NFATGFP-RQR8 que se ve en la **Figura 9**.

#### Demostración de la función del gen inducible por activación que contiene transposón.

Para demostrar la función del transposón pVAX1PB NFATGFP-RQR8 del Ejemplo 4 (ver la **Figura 9**), se electroporaron 43106 PBMC en presencia de 5 µg de cada uno de los plásmidos de transposón y transposasa. Las células electroporadas se dejaron descansar durante 24 horas y luego se estimularon de forma no específica durante la noche con 50 ng/ml de miristateacetato de forbol (PMA: Sigma-Aldrich) y 1 µg/ml de ionomicina (Sigma-Aldrich) y se compararon con controles no estimulados. Las células transducidas se identificaron mediante tinción con QBEnd10 para determinar la expresión del marcador RQR8 y se evaluó la expresión del gen inducido por activación (eGFP) a las 19 horas. En ese momento, se observó que el 50 % de las células transducidas expresaban eGFP (**Figura 10**).

Ejemplo 5: Diseño de tratamientos biológicos controlados por KM.CAR.

5 También se construyeron plásmidos de expresión que contenían IL-12 y/o el antagonista del receptor de interleucina-6 SANT7 y que contenían el receptor quimérico de antígeno optimizado con la expresión de IL-12 y/o SANT7 bajo el control de un promotor inducible por activación (Hooijberg et al. 2000). La secuencia SANT-7 fue proporcionada por el profesor Rocco Savino y se basó en la mutación de la secuencia del gen IL-6 de tipo silvestre (Secuencia de referencia NCBI: NM\_000600.4) proporcionada por Savino et al 1994 y Sporeno et al 1996(14-17). La secuencia se importó a Clone Manage 9 (Sci-Ed Software) y se añadió una etiqueta 6xHis para la detección en sobrenadantes mediante ELISA.

La secuencia de nucleótidos de SANT-7 incluye sustituciones de aminoácidos resaltadas y enumeradas a continuación:

15 MNSFSTSAFGPVAFSLGLLLVLPAAFPAPVPPGEDSKDVAAPHROPLTS SERIDKQIRDILDFISALRKETCNKSN-  
MCESSKEADAFWNLNLPKMAEKDGCIFYKGF NEETCLVKIITGLLEFEVYLEYLQNRFSSEEQARAVQMRTKDLIQ-  
FLQKKAKNLDAI TTPDPTTNASLLTKLQAQNWQLQDMTHLILRSFKEFLIRSLRALRAMHHHHHH (SEQ ID NO: 38).

Las sustituciones de nucleótidos corresponden a Y31D, G35F, L57D, E59F, N60W, Q75Y, S76K, S118R, V121D. La secuencia proporcionada también contenía una sustitución Q211A que no figura en la secuencia publicada.

20 La secuencia de ADN correspondiente a esta secuencia de aminoácidos (es decir, SEQ ID NO: 38) es la siguiente:

ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGCCTTCGGTCCAGTTGCCTTCTCCCT  
GGGGCTGCTCCTGGTGTTCCTGCTGCCTTCCCTGCCCCAGTACCCCCAGGAGAA  
GATTCCAAAGATGTAGCCGCCCCACACAGACAGCCACTCACGAGCTCAGAACGA  
ATTGACAAACAAATTCGGGACATCCTCGACTTTATCTCAGCCTTAAGAAAGGAGA  
CATGTAACAAGAGTAACATGTGTGAGAGCTCCAAAGAGGCAGACGCATTCTGGA  
ACCTGAACCTTCCAAAGATGGCTGAAAAAGATGGATGCTTCTACAAAGGATTCA  
ATGAGGAGACTTGCCTGGTGAAAATCATCACTGGTCTTCTCGAGTTTGAGGTATA  
CCTAGAGTACCTCCAGAACAGATTTGAGAGTAGTGAGGAACAAGCCAGAGCTGT  
GCAGATGCGCACAAAAGACCTGATCCAGTTCCTGCAGAAAAAGGCCAAAGAATCT  
AGATGCAATAACCAACCCCTGACCCAACCACAAATGCCAGCCTGCTGACGAAGCT  
GCAGGCACAGAACCAGTGGCTGCAGGACATGACAACTCATCTCATTCTGAGATC  
TTTAAAGGAGTTCTGATCCGTAGCCTGAGGGCTCTTCGGGCTATGCATCATCAC  
CATCACCCT (SEQ ID NO: 39).

25 Se diseñó un constructo de interleucina-12 monocatenario (Flexi-IL-12) al unir las subunidades p40 y p35 de IL-12 (Uniprot P29459 y P29460) con un ligador flexible (G4S)<sub>3</sub> similar a Zhang et al y Chinnasamy et al (18, 19), que permite que ambas subunidades se expresen como una única cadena peptídica que forma fácilmente el heterodímero p70 bioactivo. Se sintetizó el constructo de Flexi-IL-12 y se clonaron constructos que contenían IL-12 y SANT7 en el casete de transposón inducible por activación descrito en la presente y mostrado en la **Figura 11**.

Además, se podría sintetizar el constructo de Flexi-IL-12 y se podrían clonar constructos que contienen IL-12 y SANT7 separados por elementos de salto ribosómico 2A en el plásmido de PiggyBac descrito en la presente y mostrado en la **Figura 7**. [0111] La secuencia de aminoácidos de Flexi-IL-12 es la siguiente:

MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEM  
VVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLS  
HSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDL  
TFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVVRGDNKEYEYSVEQCQEDSACPAAEESLP  
IEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDT  
WSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYY  
*SSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPC LHHSQNLLRAVS*  
*NMLQKARQTLEFYPTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITN*  
*GSCLASRKTSFMMALCLSSIEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVI*  
*DELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS*  
(SEQ ID NO: 40).

5 De 5' a 3', el constructo de Flexi-IL-12 contiene un péptido líder, **la subunidad p40 de IL-12**, el ligador (G4S)<sub>3</sub> y *la subunidad p35 de IL-12*.

La secuencia de ADN correspondiente a la secuencia de aminoácidos anterior (es decir, SEQ ID NO: 40) es la siguiente:

ATGTGTCACCAGCAGTTGGTCATCTCTTGGTTTTCCCTGGTTTTTCT  
 GGCATCTCCCCTCGTGGCCATATGGGAACTGAAGAAAGATGTTTATGTCTAGAA  
 TTGGATTGGTATCCGGATGCCCCCTGGAGAAATGGTGGTCCTCACCTGTGACACCC  
 CTGAAGAAGATGGTATCACCTGGACCTTGGACCAGAGCAGTGAGGTCTTAGGCT  
 CTGGCAAAACCCTGACCATCCAAGTCAAAGAGTTTGGAGATGCTGGCCAGTACA  
 CCTGTACAAAGGAGGCGAGGTTCTAAGCCATTTCGCTCCTGCTGCTTCACAAAAA  
 GGAAGATGGAATTTGGTCCACTGATATTTTAAAGGACCAGAAAGAACCCAAAAA  
 TAAGACCTTTCTAAGATGCGAGGCCAAGAATTATTCTGGACGTTTCACCTGCTGG  
 TGGCTGACGACAATCAGTACTGATTTGACATTCAAGTGTCAAAGCAGCAGAGGC  
 TCTTCTGACCCCCAAGGGGTGACGTGCGGAGCTGCTACACTCTCTGCAGAGAGAG  
 TCAGAGGGGACAACAAGGAGTATGAGTACTCAGTGGAGTGCCAGGAGGACAGT  
 GCCTGCCCAGCTGCTGAGGAGAGTCTGCCCATTGAGGTCATGGTGGATGCCGTTT  
 ACAAGCTCAAGTATGAAAACCTACACCAGCAGCTTCTTCATCAGGGACATCATCA  
 AACCTGACCCACCCAAGAAGTTCAGCTGAAGCCATTAAAGAATTCTCGGCAGG  
 TGGAGGTCAGCTGGGAGTACCCTGACACCTGGAGTACTCCACATTCCTACTTCTC  
 CCTGACATTCTGCGTTCAGGTCCAGGGCAAGAGCAAGAGAGAAAAAGAGATAG  
 AGTCTTCACGGACAAGACCTCAGCCACGGTCATCTGCCGCAAAAATGCCAGCAT  
 TAGCGTGCGGGCCCAGGACCGCTACTATAGCTCATCTTGGAGCGAATGGGCATCT  
 GTGCCCTGCAGTGGTGGCGGTGGAAGCGGCGGTGGCGGAAGCGGCGGTGGCGGC  
 AGCAGAAACCTCCCCGTGGCCACTCCAGACCCAGGAATGTTCCCATGCCTTCACC  
 ACTCCCAAAACCTGCTGAGGGCCGTCAGCAACATGCTCCAGAAGGCCAGACAAA  
 CTCTAGAATTTTACCCTTGCATTCTGAAGAGATTGATCATGAAGATATCACAAA  
 AGATAAAACCAGCACAGTGGAGGCCTGTTTACCATTGGAATTAACCAAGAATGA  
 GAGTTGCCTAAATTCCAGAGAGACCTCTTTCATAACTAATGGGAGTTGCCTGGCC  
 TCCAGAAAGACCTCTTTTATGATGGCCCTGTGCCTTAGTAGTATTTATGAAGACTT  
 GAAGATGTACCAGGTGGAGTTCAAGACCATGAATGCAAAGCTTCTGATGGATCC  
 TAAGAGGCAGATCTTTCTAGATCAAAACATGCTGGCAGTTATTGATGAGCTGATG  
 CAGGCCCTGAATTTCAACAGTGAGACTGTGCCACAAAAATCCTCCCTTGAAGAAC  
 CGGATTTTTATAAACTAAAATCAAGCTCTGCATACTTCTTCATGCTTTCAGAATT  
 CGGGCAGTGACTATTGATAGAGTGATGAGCTATCTGAATGCTTCC (SEQ ID NO:

41).

- 5 Además, también se construyen plásmidos de expresión que contienen la forma negativa dominante troncada de Galectina-3, GAL3C. El constructo contiene un **péptido líder alfa CD8** para dirigir la secreción, así como una etiqueta 6xHis para la detección. La secuencia de aminoácidos de GAL3C se enumera aquí:

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSRHHHHHHGAPAGPLIVPYNLPLPGGV  
 VPRMLITILGTVKPNANRIALDFQRGNDVAFHFNPRFNENNRRVIVCNTKLDNNWGR  
 EERQSVFPFESGKPFKIQVLVEPDHFKVAVNDAHLLQYNHRVKKLNEISKLGISGDID  
 LTSASYTMI (SEQ ID NO: 42)

La secuencia de ADN correspondiente para el constructo GAL 3C se proporciona aquí:

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGG  
 TGTCCAGTGCTCTAGACATCATCACCATCACCACGGCGCCCCTGCTGGGCCACTG  
 ATTGTGCCTTATAACCTGCCTTTGCCTGGGGGAGTGGTGCCTCGCATGCTGATAA  
 CAATTCTGGGCACGGTGAAGCCCAATGCAAACAGAATTGCTTTAGATTTCCAAAG  
 AGGGAATGATGTTGCCTTCCACTTTAACCCACGCTTCAATGAGAACAACAGGAG  
 AGTCATTGTTTGCAATACAAAGCTGGATAATAACTGGGGAAGGGAAGAAAGACA  
 GTCGGTTTTCCCATTTGAAAGTGGGAAACCATTCAAAATACAAGTACTGGTTGAA  
 CCTGACCACTTCAAGGTTGCAGTGAATGATGCTCACTTGTGTCAGTACAATCATC  
 GGGTTAAAAAACTCAATGAAATCAGCAAACCTGGGAATTTCTGGTGACATAGACC  
 TCACCAGTGCTTCATATACCATGATA (SEQ ID NO: 43)

Los plásmidos de transposones CAR y "biológicos" se nucleofectarán para generar linfocitos T CAR que expresen IL-12 sola, SANT7 sola, GAL3C sola o ambas IL-12 y SANT7 o ambas IL12 y GAL3C o ambas SANT7 y GAL3C o las tres IL-12, SANT7 y GAL3C. Las células transducidas con éxito con constructos "biológicos" pueden identificarse mediante la expresión de marcadores seleccionables, por ejemplo, mediante citometría de flujo. Niveles de IL-12, SANT7. Y o GAL3C se medirá intracelularmente mediante citometría de flujo de citocinas y en sobrenadantes de cultivos de linfocitos T CAR mediante ELISA utilizando kits y reactivos comerciales y se comparará con los linfocitos T de control que expresan CAR solo. Se evaluará la función de los linfocitos T CAR mediante citometría de flujo de citocinas y ensayos de citotoxicidad como se indicó anteriormente, así como ensayos de cocultivo con líneas celulares de mieloma para evaluar la inhibición del crecimiento tumoral. Los experimentos se realizarán por triplicado y se elegirán los 2 constructos CAR óptimos identificados para evaluarlos en un modelo murino con y sin expresión de IL-12, GAL3C y/o SANT7.

En función del modelo de xenoinjerto murino de mieloma humano RPMI-Rag previamente establecido, se desarrollarán los modelos RPMI-Rag-Luc (KMA-) y JJN3-Rag-Luc (KMA+) para evaluar la función de los linfocitos T CAR *in vivo*. Las células JJN3 y RPMI8226 se transfectarán con Luc-1 y luego se inocularán i.v. en ratones Rag2-/-yc-/- (BALB/c) para formar los modelos JJN3-Rag-Luc y RPMI-Rag-Luc MM. Los niveles de injerto y enfermedad se controlarán mediante imágenes ópticas después de la inyección IP con luciferina y se correlacionarán con los niveles de la cadena liviana sérica kappa (JJN3) y lambda (RPMI) humana. El momento óptimo para la inoculación con linfocitos T CAR candidatos se establecerá mediante imágenes ópticas antes del desarrollo de la parálisis de las extremidades traseras, generalmente entre las semanas 5 y 8. Se inocularán cohortes de 6 ratones JJN3-Rag-Luc y RPMI-Rag-Luc por vía intravenosa con dosis crecientes de linfocitos T CAR (con y sin expresión de IL-12/SANT7) para establecer la dosis terapéutica a partir de 13106 células totales. Se tomarán imágenes de los ratones los días 0, +1, +3, +8 y semanalmente a partir de entonces hasta la progresión de la enfermedad según lo determinado por el desarrollo de parálisis de las extremidades posteriores, el aumento de las cadenas livianas libres en suero (SFLC) u otras pautas institucionales. Los tumores medulares y extramedulares se recolectarán y examinarán histológicamente para determinar la distribución de células MM y linfocitos T CAR. La eficacia estará determinada por la respuesta de las imágenes y la supervivencia en comparación con los controles.

## Referencias

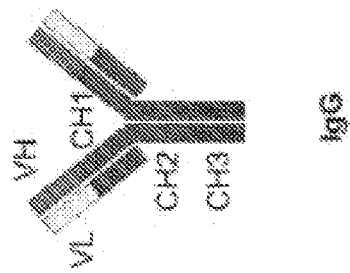
1. Rossig C, Pscherer S, Landmeier S, Altvater B, Jurgens H, Vormoor J. Adoptive cellular immunotherapy with CD19-specific T cells. *Klin Padiatr.* 2005;217(6):351-6.
- 5 2. Ramanayake S, Bilton I, Bishop D, Dubosq MC, Blyth E, Clancy L, et al. Low-cost generation of Good Manufacturing Practice-grade CD19-specific chimeric antigen receptor-expressing T cells using piggyBac gene transfer and patient-derived materials. *Cytotherapy.* 2015.
3. Hombach A, Hombach AA, Abken H. Adoptive immunotherapy with genetically engineered T cells: modification of the IgG1 Fc 'spacer' domain in the extracellular moiety of chimeric antigen receptors avoids 'off-target' activation and unintended initiation of an innate immune response. *Gene Ther.* 2010;17(10):1206-13.
- 10 4. Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG, Rae J, Briggs J, et al. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J Biol Chem.* 2001;276(9):6591-604.
5. Armour KL, van de Winkel JG, Williamson LM, Clark MR. Differential binding to human Fc gamma RIla and Fc gamma RIlb receptors by human IgG wildtype and mutant antibodies. *Mol Immunol.* 2003;40(9):585-93.
- 15 6. Hudecek M, Sommermeyer D, Kosasih PL, Silva-Benedict A, Liu L, Rader C, et al. The nonsignaling extracellular spacer domain of chimeric antigen receptors is decisive for in vivo antitumor activity. *Cancer immunology research.* 2015;3(2):125-35.
7. Clemenceau B, Valsesia-Wittmann S, Jallas AC, Vivien R, Rousseau R, Marabelle A, et al. In Vitro and In Vivo Comparison of Lymphocytes Transduced with a Human CD16 or with a Chimeric Antigen Receptor Reveals Potential Off-Target Interactions due to the IgG2 CH2-CH3 CAR-Spacer. *J Immunol Res.* 2015;2015:482089.
- 20 8. Fiering S, Northrop JP, Nolan GP, Mattila PS, Crabtree GR, Herzenberg LA. Single cell assay of a transcription factor reveals a threshold in transcription activated by signals emanating from the T-cell antigen receptor. *Genes Dev.* 1990;4(10):1823-34.
- 25 9. Miller WL, Martial JA, Baxter JD. Molecular cloning of DNA complementary to bovine growth hormone mRNA. *J Biol Chem.* 1980;255(16):7521-4.
10. Miller WL, Thirion JP, Martial JA. Cloning of DNA complementary to bovine prolactin mRNA. *Endocrinology.* 1980;107(3):851-3.
- 30 11. Goodwin EC, Rottman FM. The 3'-flanking sequence of the bovine growth hormone gene contains novel elements required for efficient and accurate polyadenylation. *J Biol Chem.* 1992;267(23):16330-4.
12. Chung JH, Bell AC, Felsenfeld G. Characterization of the chicken beta-globin insulator. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(2):575-80.
- 35 13. Philip B, Thomas S, Marin V, Jathoul A, Kopec A, Lynch DC, et al. A Highly Compact Epitope-Based Marker-Suicide Gene for More Convenient and Safer T-Cell Adoptive Immunotherapy. *ASH Annual Meeting Abstracts.* 2010;116(21):1473-.
14. Demartis A, Bernassola F, Savino R, Melino G, Ciliberto G. Interleukin 6 receptor superantagonists are potent inducers of human multiple myeloma cell death. *Cancer Res.* 1996;56(18):4213-8.
- 40 15. Savino R, Ciapponi L, Lahm A, Demartis A, Cabibbo A, Toniatti C, et al. Rational design of a receptor super-antagonist of human interleukin-6. *EMBO J.* 1994;13(24):5863-70.
16. Savino R, Lahm A, Salvati AL, Ciapponi L, Sporeno E, Altamura S, et al. Generation of interleukin-6 receptor antagonists by molecular-modeling guided mutagenesis of residues important for gp130 activation. *EMBO J.* 1994;13(6):1357-67.
- 45 17. Sporeno E, Savino R, Ciapponi L, Paonessa G, Cabibbo A, Lahm A, et al. Human interleukin-6 receptor super-antagonists with high potency and wide spectrum on multiple myeloma cells. *Blood.* 1996;87(11):4510-9.
18. Zhang L, Kerkar SP, Yu Z, Zheng Z, Yang S, Restifo NP, et al. Improving adoptive T cell therapy by targeting and controlling IL-12 expression to the tumor environment. *Mol Ther.* 2011;19(4):751-9.
19. Chinnasamy D, Yu Z, Kerkar SP, Zhang L, Morgan RA, Restifo NP, et al. Local delivery of interleukin-12 using T cells targeting VEGF receptor-2 eradicates multiple vascularized tumors in mice. *Clin Cancer Res.* 2012;18(6):1672-83.
- 50

## REIVINDICACIONES

1. Un receptor del antígeno quimérico (CAR) que comprende uno o más dominios intracelulares de señalización y un dominio de unión al antígeno extracelular, en donde el dominio de unión al antígeno extracelular comprende un fragmento variable monocatenario (scFv) que une específicamente el antígeno de mieloma kappa (KMA), en donde el scFv comprende regiones que determinan complementariedad (CDR) derivadas de un anticuerpo monoclonal Kappa (KappaMab), en donde los CDR KappaMab comprenden SEQ ID NO: 3-8.
2. El CAR de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el uno o más dominios intracelulares de señalización comprende uno o más endodominios coestimuladores.
3. El CAR de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el uno o más endodominios coestimuladores es uno o más de un dominio CD28, un dominio  $\zeta$  CD3, un dominio 4-1BB, un dominio OX-40 o combinaciones de estos.
4. El CAR de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el scFv comprende una cadena VL y una cadena VH de un KappaMab, en donde la cadena VL comprende la SEQ ID NO: 21 y la cadena VH comprende SEQ ID NO: 22.
5. El CAR de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la cadena VL y la cadena VH del KappaMab están unidas mediante un ligador de glicina-serina, en donde el ligador de glicina-serina es un ligador de 15 aminoácidos que comprende (Gly4Ser)<sub>3</sub>.
6. El CAR de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el scFv está unido a el uno o más dominios de señalización intracelular mediante un espaciador, en donde el espaciador es una región constante de inmunoglobulina o una cadena  $\alpha$  CD8.
7. El CAR de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la región constante de inmunoglobulina comprende uno o más de un dominio bisagra de IgG, un dominio CH2 de IgG y un dominio CH3 de IgG.
8. El CAR de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, en donde el espaciador está unido al scFv mediante un ligador de glicina-serina, en donde el ligador de glicina-serina es un ligador de 15 aminoácidos que comprende (Gly4Ser)<sub>3</sub>.
9. Un linfocito T genéticamente modificado diseñado para expresar el CAR de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. El linfocito T genéticamente modificado de acuerdo con la reivindicación 9, diseñado además para expresar una o más moléculas biológicas adicionales, en donde la una o más moléculas biológicas adicionales comprenden una o más de IL-12, Galectina-3C (GAL3C) o SANT7.
11. El linfocito T genéticamente modificado de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, diseñado además para expresar una proteína de unión al factor de crecimiento de hepatocitos (HGF).
12. Se proporcionan linfocitos T modificados genéticamente para expresar receptores del antígeno quimérico (CAR), en donde cada CAR comprende uno o más dominios intracelulares de señalización y un dominio extracelular de unión al antígeno, en donde el dominio extracelular de unión al antígeno comprende un fragmento variable monocatenario (scFv) que une específicamente KMA, en donde el scFv comprende regiones que determinan complementariedad (CDR) derivadas de un anticuerpo monoclonal Kappa (KappaMab), en donde las CDR KappaMab comprenden SEQ ID NO: 3-8, para su uso en un método para tratar una malignidad que expresa KMA en un sujeto.
13. El linfocito T genéticamente modificado para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el método comprende además administrar uno o más agentes farmacéuticamente activos, en donde el uno o más agentes farmacéuticamente activos comprenden uno o más agentes quimioterapéuticos, un fármaco inmunomodulador o un inhibidor de histona desacetilasa.
14. El linfocito T genéticamente modificado para uso de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, en donde el linfocito T genéticamente modificado deriva del sujeto.
15. El linfocito T genéticamente modificado de acuerdo con la reivindicación 10, diseñado además para expresar un marcador seleccionable.

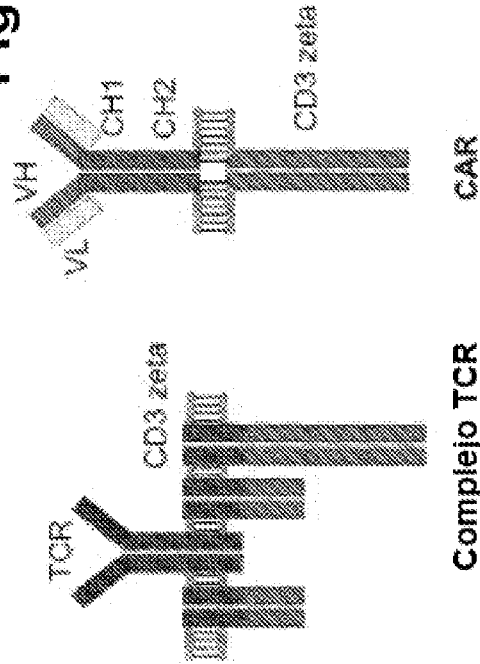


**Figura 1A**



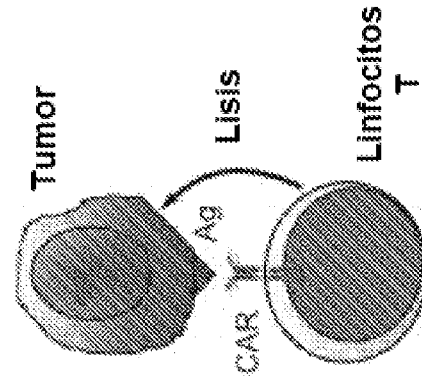
IgG

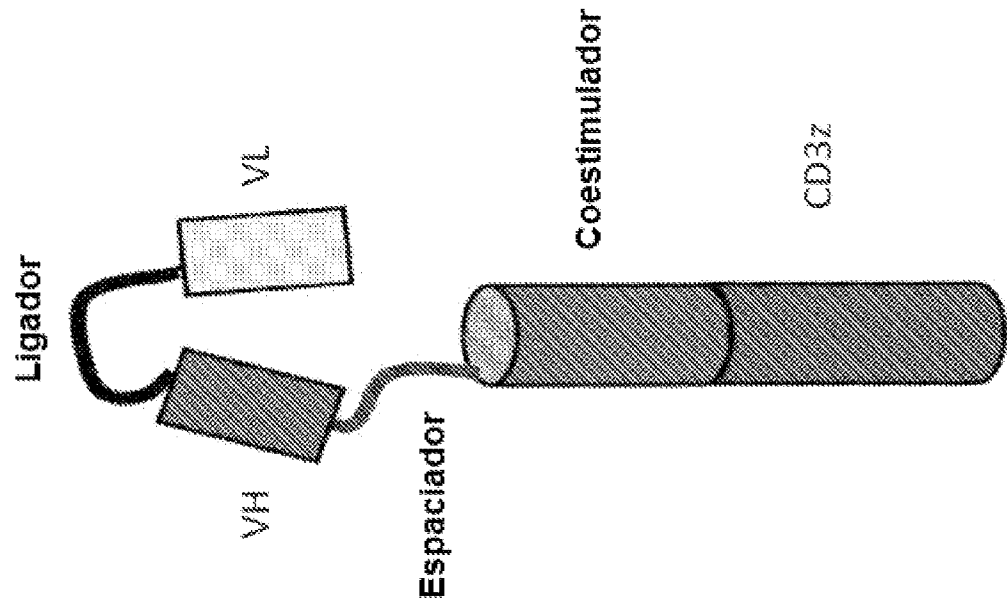
**Figura 1B**



Complejo TCR

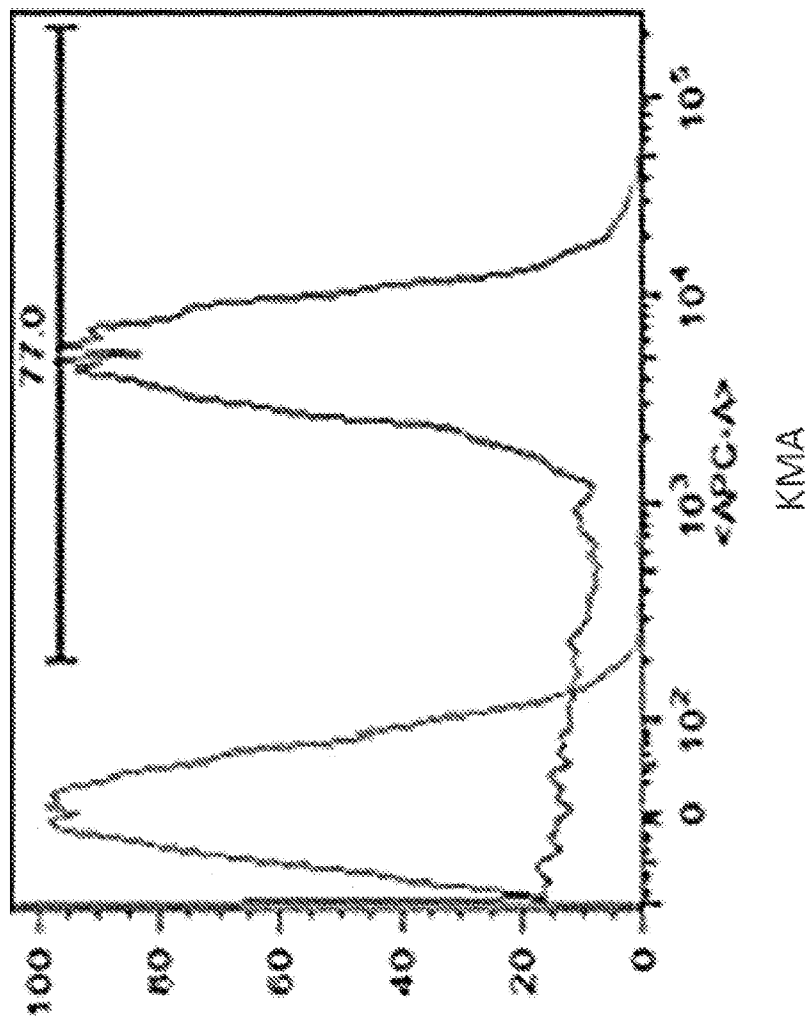
CAR





**Figura 2**

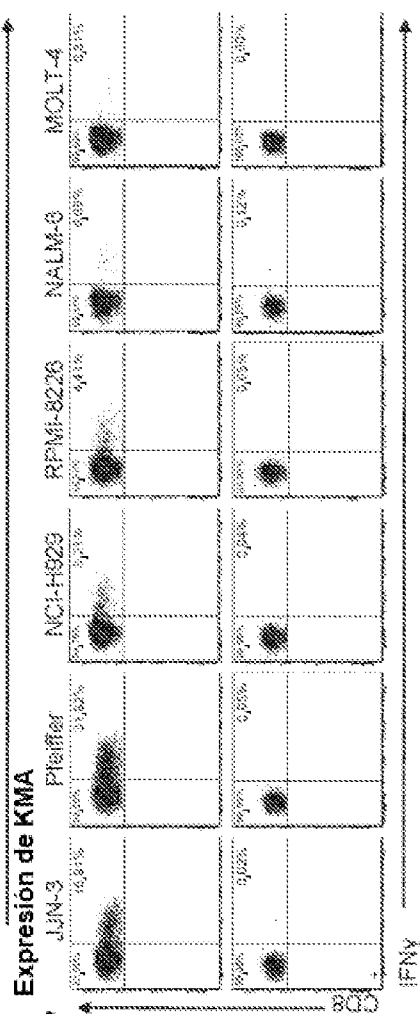
Figura 3



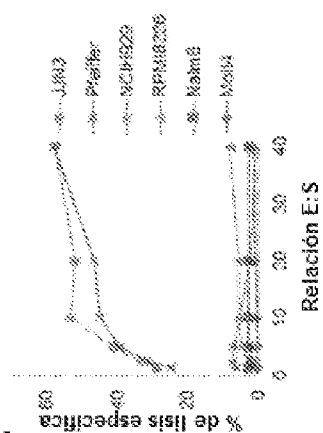
**Figura 4A**



**Figura 4B**



**Figura 4C**



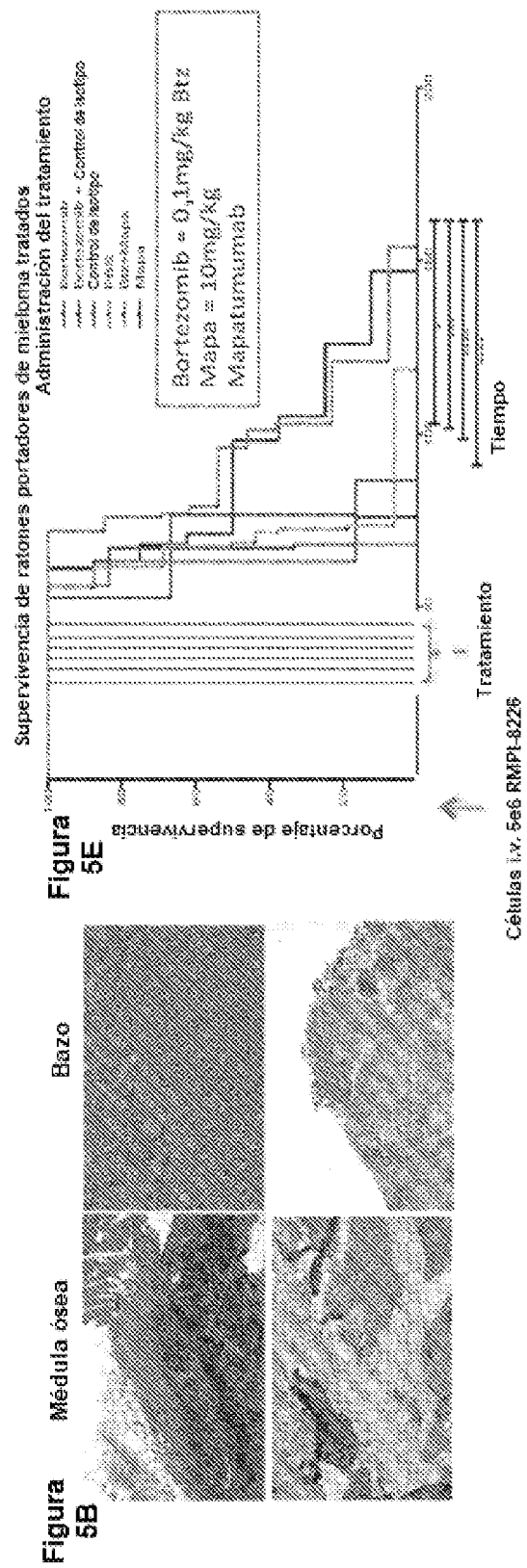
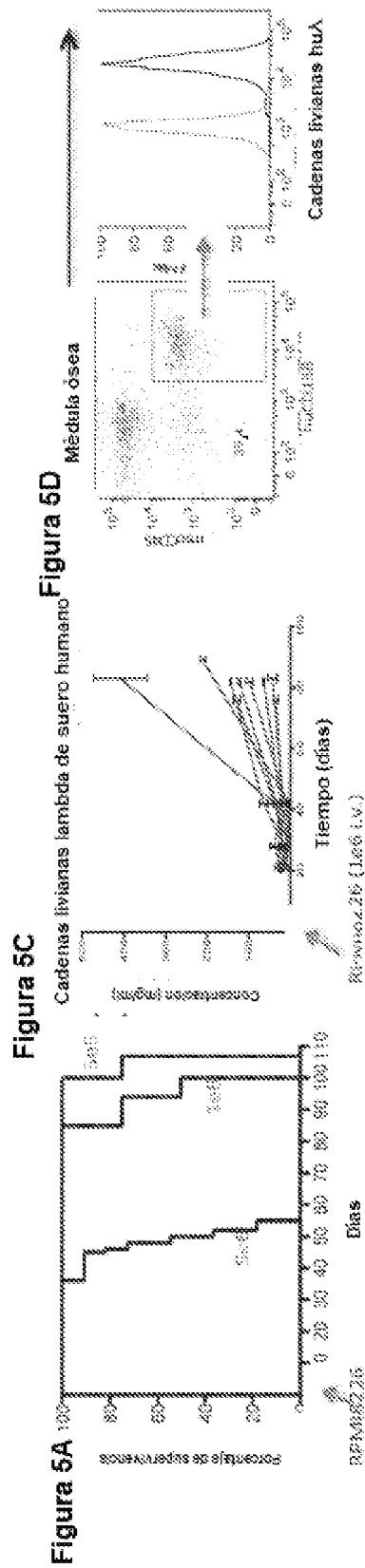


Figura 6A

scFv	hCH2CH3	CD28	CD3z
------	---------	------	------

Figura 6B

scFv	hCH3	CD28	CD3z
scFv	h	CD28	CD3z

Figura 6C

scFv	opti	4-1BB	CD3z
scFv	opti	OX-40	CD3z
scFv	opti	CD28	OX-40
scFv	opti	CD28	4-1BB
scFv	opti	4-1BB	OX-40
scFv	opti	OX-40	CD3z

Figura 7

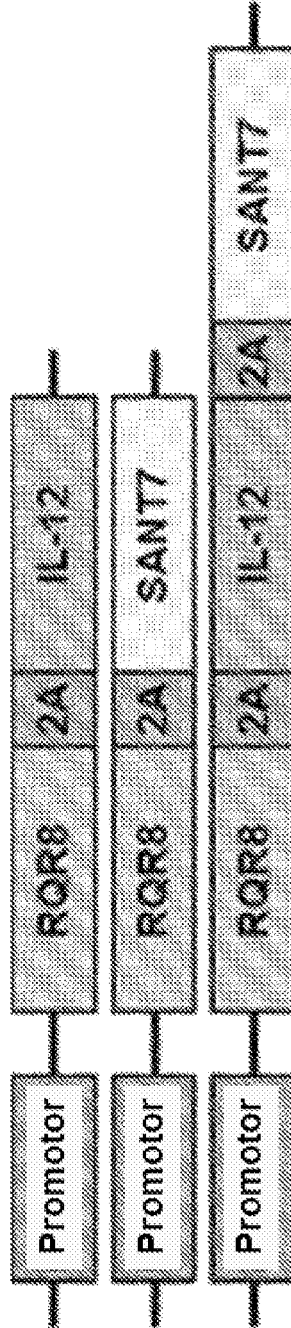


Figura 8A

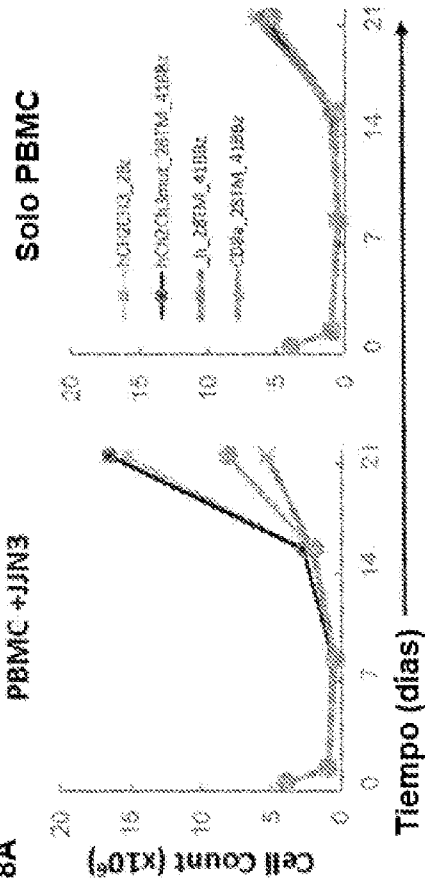


Figura 8B

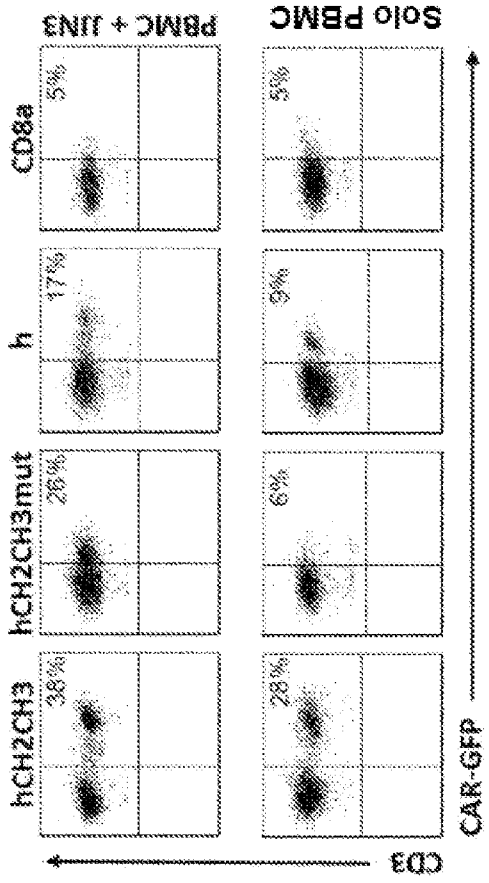




Figura 9



Figura 10

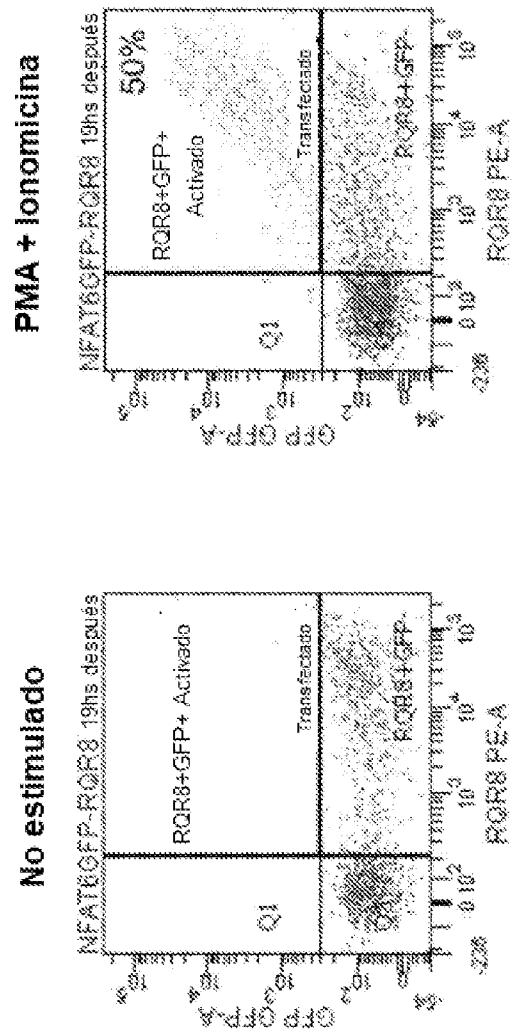
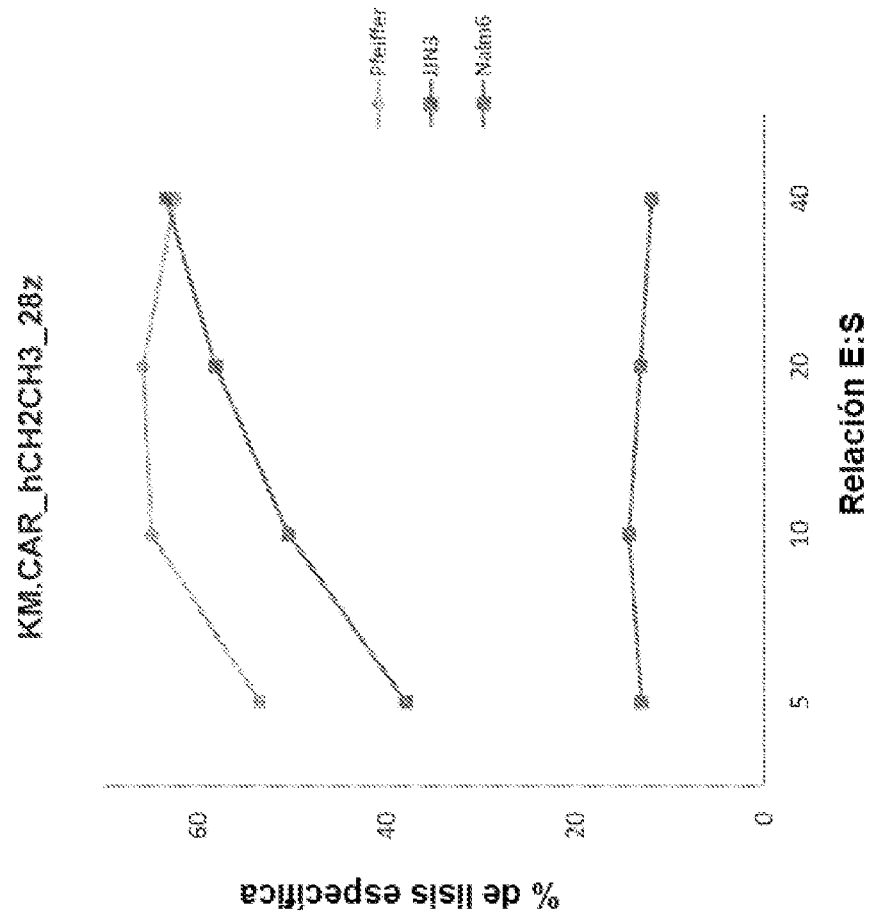


Figura 11



**Figura 12A**



**Figura 12B**

KM.CAR\_h\_28TM\_41BBz

