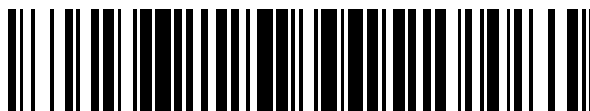


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 777 940**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 39/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 14/725 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.05.2014 PCT/US2014/036684**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.11.2014 WO14179759**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2014 E 14791494 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2020 EP 2992020**

54 Título: **Células efectoras inmunitarias genomanipuladas con un receptor de antígeno químico específico de CS1**

30 Prioridad:

03.05.2013 US 201361819141 P

11.09.2013 US 201361876492 P

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

06.08.2020

73 Titular/es:

**OHIO STATE INNOVATION FOUNDATION
(100.0%)
1524 North High Street
Columbus, OH 43201, US**

72 Inventor/es:

**YU, JIANHUA;
HOFMEISTER, CRAIG y
CHU, JIANHONG**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 777 940 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

Células efectoras inmunitarias genomanipuladas con un receptor de antígeno químico específico de CS1

5 ANTECEDENTES

- El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia maligna de células B caracterizada por la expansión clonal aberrante de las células plasmáticas (PCs) dentro de la médula ósea, con un estimado de 21.700 casos nuevos y 10.710 muertes por MM identificadas en los Estados Unidos en 2012 (Siegel R y col. Cancer J Clin 2012 62:10-29). En 2013, se estimó que 22.350 personas recibirán un diagnóstico reciente de MM en los Estados Unidos y 10.710 personas morirán a causa de él, lo que representa el 20 % de las muertes por todas las neoplasias malignas hematológicas. A pesar del uso de inhibidores del proteasoma y fármacos inmunomoduladores, que han mejorado la supervivencia general (Palumbo A, y col. Leukemia 2009 23:449-456), MM sigue siendo una neoplasia maligna incurable (Podar K, y col. Leukemia 2009 23:10-24) para la cual se necesita urgentemente nuevas estrategias terapéuticas.
- Las células T que expresan un RAQ específico para HM 1.24 se describieron como capaces de destruir células de mieloma *in vitro* (Topp M., y col., Myeloma Biology 2003: resumen #3470). Sin embargo, Topp y col. no proporcionaron ninguno de estos resultados *in vivo* que confirman estos datos *in vitro*.
- Más recientemente, las células T que coexpresaron un receptor de antígeno quimérico (CAR) específico de CD44v6 y un gen suicida se usaron para tener como objetivo la leucemia mieloide aguda positiva a CD44v6 (AML) o las células de MM (Casucci y col., Blood 2011, 118: 3125). Los resultados obtenidos en un modelo murino llevaron a los autores a la conclusión de que las células T redirigidas a CAR modificadas por el gen suicida posiblemente podrían ampliar el índice terapéutico del direccionamiento de CD44v6.
- La tecnología CAR también se usó para dirigir tumores sólidos, como el melanoma. Por ejemplo, se notificó que un polipéptido CAR dirigido a HMV-MAA, que es un antígeno altamente expresado en melanomas pero no en cultivos celulares normales, es citotóxico y prolifera en respuesta a estirpes celulares que expresan HMV-MAA (Burns y col., Cancer Research 2010, vol. 70: 3027-3033).

RESUMEN

- En esta solicitud se divulgan polipéptidos del receptor de antígeno quimérico (CAR) que pueden usarse con transferencia de células adoptivas para dirigir y destruir células de mieloma múltiple (MM). La glicoproteína de la superficie celular CS1 se expresa de manera alta y ubicua en la superficie de las células de mieloma mientras se expresa a niveles muy bajos en la mayoría de las células efectoras inmunitarias. Por lo tanto, los polipéptidos CAR divulgados contienen en un ectodominio un agente de unión anti-CS1 que puede unirse a células MM que expresan CS1. Al igual que con otros CAR, los polipéptidos divulgados también pueden contener un dominio transmembrana y un endodominio capaz de activar una célula efectora inmunitaria. Por ejemplo, el endodominio puede contener un dominio de señalización intracelular y opcionalmente una región de señalización coestimuladora.
- El agente de unión anti-CS1 es, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a CS1, tal como un Fab o un scFv. De acuerdo con la invención, el dominio de unión a antígeno es un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) de un anticuerpo que se une específicamente a CS1. Otro agente de unión anti-CS1 divulgado en esta solicitud es un aptámero que se une específicamente a CS1. Por ejemplo, el agente de unión anti-CS1 puede ser un aptámero peptídico seleccionado de entre un grupo de secuencias aleatorias en función de su capacidad para unirse a CS1. Otro agente de unión anti-CS1 divulgado en esta solicitud es un ligando natural de CS1, o una variante y/o fragmento del mismo capaz de unirse a CS1.
- En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular es un dominio de señalización CD3 zeta (CD3ζ), y la región de señalización coestimuladora comprende el dominio citoplasmático de CD28, 4-1BB, o una combinación de los mismos. En algunos casos, la región de señalización coestimuladora contiene 1, 2, 3 o 4 dominios citoplasmáticos de una o más moléculas de señalización intracelular y/o coestimulador.
- También se divulgan secuencias de ácido nucleico aislado que codifican los polipéptidos CAR divulgados, vectores que comprenden estos ácidos nucleicos aislados y células que contienen estos vectores. Por ejemplo, la célula puede ser una célula efectora inmunitaria seleccionada de entre el grupo que consiste en una célula T, una célula asesina natural (NK), un linfocito T citotóxico (CTL) y una célula T reguladora. En algunas realizaciones, la célula exhibe una inmunidad antitumoral cuando el dominio de unión a antígeno del CAR se une a CS1.
- También se divulga un procedimiento para proporcionar una inmunidad antitumoral en un sujeto con mieloma múltiple (MM) que implica administrar al sujeto una cantidad efectiva de una célula efectora inmunitaria genéticamente modificada

con un CAR específico de CS1 divulgado.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y en la descripción que se encuentra más adelante. Otras características, objetos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y a partir de las reivindicaciones.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las Figuras 1A a 1C muestran la generación de un CAR específico de CS1 y su expresión en células T transducidas con CAR. La Figura 1A es un diagrama esquemático de una construcción retroviral Pinco-CS1-CAR que contiene un scFv contra CS1 unido a los endodominios CD28 y CD3 ζ , LTR, repetición terminal larga; SP, péptido señal; VH, cadena H variable; L, enlazador; VL, cadena L variable. En la Figura 1B, las PBMC (células mononucleares de sangre periférica) se activaron con microesferas CD3 y CD28 y se transdujeron con la construcción Pinco-CS1-CAR o Pinco. Las células positivas para GFP se clasificaron, y los lisados celulares se sometieron a análisis de inmunoelectrotransferencia en condiciones reductoras con anticuerpo primario anti-CD3 ζ humano. En la Figura 1C, las células T transducidas con simulación 1 o CS1-CAR1 de donantes sanos se tiñeron con anticuerpo de control compatible específico de Fab o isotipo anti-ratón de cabra marcado con biotina, seguido de tinción con estreptavidina y anticuerpo CD3.

Las Figuras 2A a 2C muestran que las células T redirigidas por CS1 secretan más IFN- γ e IL-2 que las células T simuladas en respuesta a las estirpes celulares de mieloma que expresan CS1. La Figura 2A muestra el análisis de citometría de flujo de la expresión de CS1 en la superficie de las estirpes celulares de mieloma. Las cuatro estirpes celulares de mieloma indicadas se tiñeron con anticuerpo mAb anti-CS1 conjugado con PE (línea continua) o anticuerpo de control compatible con isotipo (línea discontinua). Las Figuras 2B y 2C son gráficos de barras que muestran la secreción de IFN- γ (Fig. 2B, ng/ml) e IL-2 (Fig. 2C, pg/ml) en células T de donantes sanos simuladas o transducidas con CS1-CAR (2×10^5) que se cultivaron solas (sin diana) o se estimularon con un número igual de células de mieloma que expresaban diferentes niveles de CS1 durante 24 horas.

Las Figuras 3A a 3D muestran que las células T redirigidas CS1 erradican preferentemente las células de mieloma que obviamente expresan la proteína CS1. En la figura 3A, células de mieloma NCI-H929 marcadas con ^{51}Cr , IM9, MM.1S y RPMI-8226 (5×10^3) se cocultivaron con células T simuladas o transducidas con CS1-CAR a las relaciones E/T indicadas durante 4 horas, y se midió la lisis diana (liberación de ^{51}Cr). En la Figura 3B, se evaluó la expresión del marcador de desgranulación CD107a y el marcador de activación de células T CD69 en células T simuladas o transducidas con CS1-CAR mediante citometría de flujo después de 4 horas de cocultivo con células NCI-H929. En comparación con las células T transducidas y simuladas, las células T transducidas con CS1-CAR mostraron una desgranulación superior y una mayor activación de las células T en respuesta a las células NCI-H929 que expresan CS1. En la Figura 3C, las células T simuladas y transducidas con CS1-CAR se permeabilizaron para la tinción intracelular con mAb específico para granzima B y perforina, y se analizaron por citometría de flujo.

Las Figuras 4A a 4D muestran que la sobreexpresión ectópica de CS1 en células MM desencadena citotoxicidad mejorada y secreción de citocinas después del reconocimiento por las células T CS1-CAR. La Figura 4A muestra la tinción por citometría de flujo para la proteína CS1 o el control del isotipo de IgG (línea discontinua) en la superficie de las células RPMI-8226 que sobreexpresan CS1 (RPMI-8226-CS1, línea gruesa continua) o un control de vector vacío (RPMI-8226-PCDH, línea fina continua). La Figura 4B es un gráfico que muestra la citotoxicidad de células T simuladas o transducidas con CS1-CAR contra células RPMI-8226-CS1 y RPMI-8226-PCDH. Las células RPMI-8226-CS1 y RPMI-8226-PCDH se incubaron con células T simuladas o transducidas con CS1-CAR en las relaciones E/T indicadas durante 4 horas, y la lisis específica se determinó usando un ensayo de liberación de ^{51}Cr estándar. Las Figuras 4C y 4D son gráficos de barras que muestran la secreción de IFN- γ (Fig. 4C, pg/ml) e IL-2 (Fig. 4D, pg/ml) en células T simuladas o transducidas con CS1-CAR (1×10^5) cultivadas solas o estimuladas con un número igual de células RPMI-8226-CS1 o RPMI-8226-PCDH.

Las Figuras 5A a 5D muestran que las células T CS1-CAR reconocen y eliminan específicamente las células de mieloma primario humano que expresan CS1 *ex vivo*. La Figura 5A muestra los resultados de citometría de flujo de PBMC de pacientes con MM que se activaron con microesferas anti-CD3 y anti-CD28, se transdujeron con la construcción (simulación) Pinco-CS1-CAR o Pinco y se tiñeron con anticuerpos anti-CD3 humanos y Fab anti-ratón. Se muestran los resultados de 1 de 4 pacientes con datos similares. La Figura 5B muestra la tinción por citometría de flujo para la proteína CS1 en células de mieloma CD138 $^{+}$ recién aisladas de pacientes con MM. Se muestran los resultados de 3 de 10 pacientes con datos similares. La Figura 5C es una serie de gráficos que muestran lisis específica (ensayo de liberación ^{51}Cr) de las células de mieloma CD138 $^{+}$ en (B) cocultivadas con las células T autólogas simuladas o transducidas con CS1-CAR en (A) en las relaciones E/T indicadas durante 4 horas. La Figura 5D es un gráfico de barras que muestra la secreción de IFN- γ (pg/ml) por las células tratadas como en (C), excepto que la relación E/T fue 1:1 y el tiempo de incubación se extendió a 24 horas.

Las Figuras 6A y 6B muestran que las células T redirigidas por CS1 inhiben el crecimiento tumoral y prolongan la

supervivencia del ratón en un modelo xenoinjerto murino ortotópico MM.1S. La Figura 6A es una serie de imágenes de bioluminiscencia dorsal y ventral de cinco ratones representativos con tumores MM.1S de cada grupo indicado. A los ratones NSG se les inoculó por vía intravenosa 8×10^6 células MM.1S que expresan luciferasa (día 0). En los días 7 y 14 después de la inoculación, cada ratón recibió PBS (grupo de control con placebo), 10×10^6 células T simuladas (grupo de control simulado) o células T CS1-CAR (grupo de tratamiento con CAR). La Figura 6B muestra las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de ratones con MM.1S tratados con PBS, células T simuladas o células T CS1-CAR.

Las Figuras 7A a 7E muestran que las células transformadas 293T que expresan CS1 fueron susceptibles de reconocimiento y lisis por las células T CS1-CAR. La Figura 7A muestra que las células parentales 293T fueron negativas para la expresión de CS1. Las células 293T se tiñeron con anticuerpo mAb anti-CS1 conjugado con PE (línea continua) o con el Ab de control compatible con isotipo (línea discontinua) y se analizaron por citometría de flujo. La Figura 7B muestra la tinción por citométrica de flujo para la proteína CS1 en la superficie de las células 293T que sobreexpresan CS1 (293T-CS1, línea gruesa continua oscura) o un vector vacío (293T-PCDH, línea gruesa continua gris). Células 293T que expresan CS1 teñidas con el isotipo de IgG (línea discontinua) sirvieron como control de unión no específico. La Figura 7C muestra la citotoxicidad de células T simuladas o transducidas con CS1-CAR contra células 293T-CS1 y 293T-PCDH. Las células 293T-CS1 y 293T-PCDH se incubaron con células T simuladas o transducidas con CS1-CAR en las relaciones E/T indicadas durante 4 h, y la lisis específica se determinó usando un ensayo de liberación ^{51}Cr estándar. Las Figuras 7D y 7E son un gráfico de barras que muestra la secreción de IFN- γ (Fig. 7D, pg/ml) o la secreción de IL-2 (Fig. 7E, pg/ml) por células T simuladas o transducidas con CS1-CAR cultivadas solas o estimuladas con células 293T-CS1 o 293T-PCDH.

Las Figuras 8A y 8B muestran que tanto las células T CS1-CAR CD4^+ y CD8^+ se activaron en respuesta a las células de mieloma. En la Figura 8A, se cultivaron células T simuladas o transducidas con CS1-CAR solas o estimuladas con células NCI-H929 y MM.1S durante 12 h, luego se evaluó la expresión superficial de CD3 y CD8, así como IFN- γ intracelular por citometría de flujo. Los trazados fueron separados en linfocitos CD3^+ . Se muestra un experimento representativo de tres con resultados similares. En la Figura 8B, las células T simuladas o transducidas con CS1-CAR se cultivaron solas o se estimularon con células NCI-H929 y MM.1S durante 4 h, y se evaluó la expresión de CD3, CD8 y el marcador de desgranulación CD107a por citometría de flujo. Los trazados fueron separados en linfocitos CD3^+ en vivo. Se muestra un experimento representativo de tres con resultados similares.

Las Figuras 9A y 9B muestran que las células T redirigidas por CS1 inhiben el crecimiento tumoral y prolongan la supervivencia del ratón en un modelo xenoinjerto murino ortotópico IM-9. La Figura 9A muestra imágenes de bioluminiscencia dorsal y ventral de cinco ratones representativos con tumores IM9 de cada grupo indicado. A los ratones NSG se les inoculó por i.v. 5×10^5 células IM9 que expresan luciferasa (día 0). En el día 7 y el día 21 después de la inoculación, cada ratón recibió PBS (grupo de control con placebo), 10×10^6 células T simuladas (grupo de control simulado) o células T CS1-CAR (grupo de tratamiento con CAR). Las cruces blancas "+" representan ratones que murieron por la enfermedad MM en el grupo tratado con PBS en el momento de la obtención de imágenes. La Figura 9B son curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de ratones con IM9 tratados con PBS, células T simuladas o células T CS1-CAR.

Las Figuras 10A a 10C muestran que las células T CS1-CAR persistieron y proliferaron en la médula ósea (BM) de ratones NSG injertados con células MM.1S. A los ratones se les inoculó 8×10^6 células MM.1S en el día 0, y en el día 7, los ratones fueron tratados con 10×10^6 células T CS1-CAR. En el día 20, a los ratones se les inyectó i.p. 1,5 mg de Brdu en solución DPBS. Los ratones se sacrificaron al día siguiente, y las células BM se aislaron para la tinción de la superficie con anticuerpos específicos para humanos CD45 y CD3 y/o anticuerpos anti-Brdu (BD Biosciences) siguiendo el protocolo del fabricante. La Figura 10A muestra el porcentaje de células T humanas ($\text{CD45}^+/\text{CD3}^+$) en la BM de ratones representativos. En la Figura 10B, las células T humanas separadas ($\text{CD45}^+/\text{CD3}^+$) se tiñeron con IgG (panel izquierdo) o Ab anti-Fab (panel derecho) para verificar la expresión de CAR. En la Figura 10C, las células T humanas separadas ($\text{CD45}^+/\text{CD3}^+$) se tiñeron con IgG (panel izquierdo) o Ab anti-Brdu, y se muestra el porcentaje de células T incorporadas en Brdu.

Las Figuras 11A a 11C muestran que las células T CS1-CAR muestran bajos niveles de reactividad contra las células NK y T primarias. Las células NK y T primarias humanas marcadas con ^{51}Cr (5×10^3) se cocultivaron con células T simuladas o transducidas con CS1-CAR en las relaciones Efectora/Diana (E/T) indicadas durante 4 h, y se midió la lisis diana con liberación ^{51}Cr de las células NK (Fig. 11A) y las células T (Fig. 11B). La Figura 11C es un gráfico de barras que muestra la secreción de IFN- γ por células T simuladas o transducidas con CS1-CAR cultivadas solas o estimuladas con células NK primarias, células T o células de mieloma durante 24 h.

La Figura 12 muestra que las células NK primarias o las células T no desencadenaron la muerte celular inducida por activación aparente (AICD) en las células T CS1-CAR. Las células NK primarias y las células T se incubaron con un número igual de células T simuladas o transducidas con CS1-CAR marcadas con ^{51}Cr durante 12 h. La lisis específica se determinó usando un ensayo de liberación ^{51}Cr .

- Las Figuras 13A a 13C muestran la generación de un CAR específico de CS1 y su expresión en células NK transducidas con CAR. La Figura 13A es una representación esquemática de la construcción lentiviral CS1-CAR. La Figura 13B muestra el análisis de inmunoelectrotransferencia de la expresión de CS1-CAR usando un Ab específico de CD3 ζ . Los datos mostrados son representativos de tres experimentos con resultados similares. La Figura 13C muestra la expresión de scFv quimérico CS1 en la superficie de células NK-92 y NKL clasificadas por FACS transducidas con la construcción CS1-CAR o vector vacío (EV) analizado por citometría de flujo después de que las células se tiñeran con un anticuerpo anti-myc o un control de isotipo de IgG1. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos con resultados similares.
- 10 Las Figuras 14A a 14D muestran que las células CS1-CAR NK erradican CS1⁺ pero no las células MM CS1⁻. La Figura 14A muestra la determinación de la expresión de CS1 en la superficie de las estirpes celulares MM L363, IM9 y U266 mediante citometría de flujo después de que las células se tiñeran con mAb anti-CS1 o anticuerpo de control compatible con isotipo. Las Figuras 14B a 14D muestran la actividad citotóxica de células NK-92 o NKL transducidas y simuladas o transducidas con CS1-CAR contra células IM9 (Fig. 14B), L363 (Fig. 14C) y U266 (Fig. 14D) usando un ensayo de liberación ⁵¹Cr estándar. NK-92-EV y NKL-EV indican células NK-92 y NKL transducidas con control de vector vacío (EV), respectivamente. NK-92-CS1-CAR y NKL-CS1-CAR indican la transducción de células NK-92 y NKL, respectivamente, con una construcción CS1-CAR. * y ** indican P <0,05 y P<0,01, respectivamente.
- 15 Las Figuras 15A a 15C muestran el reconocimiento de las células MM CS1⁺ que inducen una respuesta más fuerte de las células CS1-CAR NK que de las células NK de control. Las Figuras 15A a 15C son gráficos de barras que muestran la secreción de IFN- γ por células efectoras NK-92 o NKL transducidas y simuladas o transducidas con CS1-CAR cocultivadas con un número igual de células de mieloma IM9 (Fig. 15A), L363 (Fig. 15B) o U266 (Fig. 15C) durante 24 h. NK-92-EV y NKL-EV indican células NK-92 y NKL transducidas con control de vector vacío (EV), respectivamente. NK-92-CS1-CAR y NKL-CS1-CAR indican la transducción de células NK-92 y NKL, respectivamente, con una construcción CS1-CAR.
- 20 Las Figuras 16A a 16C muestran que el reconocimiento de la diana mejorada de las células NK-92-CS1-CAR depende de la expresión de CS1 en las células MM. La Figura 16A muestra la tinción por citometría de flujo para una proteína CS1 o un control de IgG (línea continua) en la superficie de las células U266 que sobreexpresan CS1 (U266-CS1, línea gruesa continua) o un control de vector vacío (U266-Vector, línea fina continua). La Figura 16B muestra la citotoxicidad de células NK-92 simuladas o transducidas con CS1-CAR (NK-92-EV y NK-92-CS1-CAR, respectivamente) contra células U266-Vector y U266-CS1. Las células U266-Vector o U266-CS1 se incubaron con células NK-92-CS1-CAR o NK-92-EV en diferentes relaciones Efector/Diana (E/T) durante 4 h. La lisis específica se determinó usando un ensayo de liberación ⁵¹Cr estándar. ** indica P <0,05. (c) Las células NK-92-CS1-CAR o NK-92-EV se cocultivaron con un número igual de células de mieloma U266-Vector o U266-CS1 durante 24 h. Los sobrenadantes se recogieron para medir la secreción de IFN- γ usando ELISA.
- 30 Las Figuras 17A a 17C muestran la caracterización fenotípica de células NK modificadas con CS1-CAR. En la Figura 17A, las células NK-92 simuladas o transducidas con CS1-CAR (NK-92-EV y NK-92-CS1-CAR, respectivamente) se cultivaron solas o se cultivaron con células MM IM9 durante 4 h. La expresión superficial de Nkp30, Nkp46, NKG2C, NKG2D, CD69 y HLA-DR se evaluó mediante citometría de flujo después de la tinción con los mAbs correspondientes, y se registró la intensidad de fluorescencia media (MFI). * indica P <0,05. En la Figura 17B, las células NK-92-EV y NK-92-CS1-CAR se permeabilizaron para la tinción intracelular con mAb específico para perforina o granzima B, y se analizaron por citometría de flujo. La línea de puntos representa la tinción de las células de control NK-92-EV con el anticuerpo de IgG de control, la línea gruesa continua indica la tinción de las células NK-92-CS1-CAR con el anticuerpo para perforina o granzima B, y la línea fina continua indica la tinción de células de control NK-92 -EV con anticuerpo para perforina o granzima B. La Figura 17C muestra MFI para histogramas que se muestran en la Figura 17B. * indica P <0,05.
- 40 Las Figuras 18A a 18C muestran que las células NK-92 transducidas con CS1-CAR aumentan la destrucción de células de mieloma humano primario. La Figura 18A muestra la tinción por citometría de flujo para la proteína CS1 o el control del isotipo de IgG, lo que demuestra que las células de mieloma primario CD138⁺ expresan altamente CS1. Los histogramas abiertos y rellenos representan la tinción con anticuerpos de control compatible con isotipo y anticuerpos anti-CS1, respectivamente. Los datos mostrados son representativos de dos de seis muestras de pacientes con resultados similares. La Figura 18B muestra la actividad citotóxica de células NK-92 simuladas o transducidas con CS1-CAR (NK-92-EV y NK-92-CS1-CAR, respectivamente) contra células de mieloma primario CD138⁺ de tres de seis pacientes con resultados similares usando un ensayo de liberación ⁵¹Cr estándar. E/T indica la relación célula efectora/célula diana. * indica P <0,05. La Figura 18C muestra la secreción de IFN- γ por células de mieloma primario CD138⁺ cocultivadas con células NK-92-EV o NK-92-CS1-CAR en una relación E/T de 5:1 durante 24 h. Los datos mostrados son representativos de una de cada tres muestras de pacientes con resultados similares.
- 50 Las Figuras 19A a 19D muestran que las células CS1-CAR NK suprimen *in vivo* el crecimiento de células MM humanas ortotópicas y prolongan la supervivencia de ratones con MM. La Figura 19A (izquierda) es una imagen que muestra la

infiltración masiva de células IM9 humanas, detectada por tinción con hematoxilina-eosina (H y E), en las lesiones óseas de las vértebras lumbares de un ratón representativo que muestra parálisis de las patas traseras después de inyectar por i.v. células IM9. La Figura 19A (derecha) muestra la tinción inmunohistoquímica de lesiones óseas de vértebras lumbares de ratón con mAb CD138 anti-humano. La Figura 19B muestra imágenes de bioluminiscencia dorsal de ratones con tumores IM9. A los ratones NSG se les inoculó 5×10^5 células IM9 que expresan luciferasa a través de una inyección en la vena de la cola (día 0). Siete días después de la inoculación, los ratones fueron tratados con células NK-92 transducidas y simuladas (NK-92-EV), células NK-92 transducidas con CS1-CAR (NK-92-CS1-CAR) o solución salina tamponada con fosfato (un control negativo). La Figura 19C es un gráfico de barras que muestra un resumen de cuantificación de unidades de fotones por segundo por ratón de la Figura 19B. * indica $P < 0,05$; ** denota $P < 0,01$. La Figura 19D muestra las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de ratones con IM9 tratados con células NK-92-CS1-CAR en comparación con los ratones tratados con células NK-92-EV. * indica $P < 0,05$.

La Figura 20 muestra que la introducción de CS1 CAR no conduce a una apoptosis sustancial en las estirpes celulares NK. Las células NK92 o NKL simuladas o transducidas con CS1-CAR se tiñeron con 7AAD y anexina V-V450, seguido de un análisis de citometría de flujo. NK-92-EV y NKL-EV indican células NK-92 y NKL transducidas con control de vector vacío (EV), respectivamente. NK-92-CS1-CAR y NKL-CS1-CAR indican la transducción de células NK-92 y NKL, respectivamente, con una construcción CS1-CAR.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En esta solicitud se divulgan receptores de antígeno quimérico (CAR) que pueden reconocer específicamente antígenos asociados a tumores (TAA) en células de mieloma múltiple (MM). También se divulgan las células efectoras inmunitarias, como las células T o las células asesinas naturales (NK), que están genomanipuladas para expresar estos CAR. Por lo tanto, también se divulgan procedimientos para proporcionar una inmunidad antitumoral en un sujeto con MM que implica la transferencia adoptiva de las células efectoras inmunitarias divulgadas genomanipuladas para expresar los CAR específicos de CS1 divulgados.

Receptores de antígeno quimérico específicos (CAR) de CS1

Los CAR generalmente incorporan un dominio de reconocimiento de antígeno de los fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) de un anticuerpo monoclonal (mAb) con motivos de señalización transmembrana implicados en la activación de linfocitos (Sadelain M, y col. Nat Rev Cancer 2003 3:35-45). La glicoproteína CS1 de la superficie celular se expresa de manera alta y ubicua en la superficie de las células de mieloma (Hsi ED, y col. Clin Cancer Res 2008 14:2775-84). CS1 se expresa a niveles muy bajos en la mayoría de las células efectoras inmunitarias, incluidas las células asesinas naturales (NK), algunos subconjuntos de células T y células B normales, y es casi indetectable en las células mieloides (Hsi ED, y col. Clin Cancer Res 2008 14:2775-84). En particular, CS1 se expresa de manera insignificante en células madre hematopoyéticas humanas (Hsi ED, y col. Clin Cancer Res 2008 14:2775-84), que se puede utilizar para el trasplante de células madre para tratar neoplasias malignas hematológicas, incluido el MM. Las funciones de CS1 en MM permanecen sin entender por completo, y se ha documentado que CS1 puede desempeñar un papel en la adhesión celular del mieloma, el crecimiento clonogénico y la tumorigenicidad (Benson DM Jr, y col. J Clin Oncol 2012 30:2013-5; Tai YT, y col. Blood 2009 113:4309-18). Se ha demostrado que dirigirse a CS1 con el mAb humanizado elotuzumab es seguro en la clínica (Benson DM Jr, y col. J Clin Oncol 2012 30:2013-5; Tai YT, y col. Blood 2009 113:4309-18). Los estudios preclínicos muestran que este anticuerpo inhibe la adhesión de las células del mieloma a las células del estroma de la médula ósea, induce la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos mediada por células NK y erradica los tumores de xenoinjerto iniciados por las células de mieloma humano en ratones inmunodeficientes (Benson DM Jr, y col. J Clin Oncol 2012 30:2013-5; Tai YT, y col. Blood 2009 113:4309-18; Tai YT, y col. Blood 2008 112:1329-37). Por lo tanto, se divulga en esta solicitud un receptor de antígeno quimérico (CAR) específico de CS1 que puede expresarse en células efectoras inmunitarias para mejorar la actividad antitumoral contra el mieloma múltiple humano.

El CAR divulgado generalmente se compone de tres dominios: un ectodominio, un dominio transmembrana y un endodominio. El ectodominio comprende la región de unión a CS1 y es responsable del reconocimiento de antígeno. También generalmente contiene un péptido señal (SP) para que el CAR pueda ser glicosilado y anclado en la membrana celular de la célula efectora inmunitaria. El dominio transmembrana (TD), como su nombre lo indica, conecta el ectodominio con el endodominio y reside dentro de la membrana celular cuando es expresado por una célula. El endodominio es el extremo de establecimiento del CAR que transmite una señal de activación a la célula efectora inmunitaria después del reconocimiento de antígeno. Por ejemplo, el endodominio puede contener un dominio de señalización intracelular (ISD) y opcionalmente una región de señalización coestimuladora (CSR).

En algunas realizaciones, el CAR divulgado se define por la fórmula:

SP-CS1-HG-TM-CSR-ISD;

donde "SP" representa un péptido señal,
 donde "CS1" representa un dominio de unión al antígeno CS1,
 donde "HG" representa un dominio de bisagra opcional,
 5 donde "TM" representa un dominio transmembrana,
 donde "ISD" representa un dominio de señalización intracelular, y
 donde "-" representa un enlazador bivalente.

También se describe en esta invención que un CAR se define por la fórmula:

10

SP-CS1-HG-TM-CSR-ISD;

SP-CS1-HG-TM-ISD-CSR donde "SP", "CS1", "HG", "TM", "ISD" y "-" son como se describieron anteriormente y donde
 "CSR" representa una región de señalización coestimuladora. El dominio de unión a antígeno del CAR divulgado es
 15 usualmente un scFv. Sin embargo, hay muchas alternativas. Se ha descrito un dominio de unión a antígeno de las cadenas
 sencillas alfa y beta del receptor nativo de células T (TCR), al igual que los ectodominios simples (por ejemplo, ectodominio
 CD4 para reconocer células infectadas por VIH) y componentes de reconocimiento más exóticos, como una citocina unida
 (que conduce a reconocimiento de células que llevan el receptor de citocinas). De hecho, casi cualquier cosa que se una
 a una diana dada con alta afinidad puede usarse como una región de reconocimiento de antígeno.

20

El endodominio es el extremo de establecimiento del CAR que, después del reconocimiento de antígeno (es decir, CS1)
 transmite una señal a la célula efectora inmunitaria, activando al menos una de las funciones efectoras normales de la
 célula efectora inmunitaria. La función efectora de una célula T, por ejemplo, puede ser actividad citolítica o actividad
 auxiliar, incluida la secreción de citocinas. Por lo tanto, el endodominio puede comprender el "dominio de señalización
 25 intracelular" de un receptor de células T (TCR) y co-receptores opcionales. Si bien generalmente se puede emplear todo
 el dominio de señalización intracelular, en muchos casos no es necesario usar toda la cadena. En la medida en que se
 use una porción truncada del dominio de señalización intracelular, dicha porción truncada se puede usar en lugar de la
 cadena intacta siempre que transduzca la señal de función efectora.

30 Las secuencias de señalización citoplasmáticas que regulan la activación primaria del complejo TCR que actúan de
 manera estimuladora pueden contener motivos de señalización que se conocen como motivos de activación de
 inmunorreceptor basados en tirosina (ITAM). Ejemplos de secuencias de señalización citoplasmáticas que contienen
 ITAM incluyen las derivadas de TCR zeta, FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD5, CD22,
 CD79a, CD79b y CD66d. Sin embargo, en realizaciones preferidas, el dominio de señalización intracelular se deriva de
 35 CD3 zeta (CD3ζ).

La cadena de glicoproteína de superficie de células T CD3 zeta (CD3ζ), también conocida como cadena de zeta T3 del
 receptor de células T o CD247 (grupo de diferenciación 247), es una proteína que en humanos está codificada por el gen
 CD247.

40

Los CAR de primera generación generalmente tenían el dominio intracelular de la cadena CD3ζ, que es el principal
 transmisor de señales de los TCR endógenos. Los CAR de segunda generación agregan dominios de señalización
 intracelular de varios receptores de proteínas coestimuladoras (por ejemplo, CD28, 41BB, ICOS) al endodominio del CAR
 para proporcionar señales adicionales a la célula T. Los estudios preclínicos han indicado que la segunda generación de
 45 diseños CAR mejora la actividad antitumoral de las células T. Más recientemente, los CAR de tercera generación
 combinan múltiples dominios de señalización para aumentar aún más la potencia. Las células T injertadas con estos CAR
 han demostrado una mejoría en la expansión, activación, persistencia y eficacia de erradicación de tumores,
 independientemente de la interacción coestimuladora del receptor/ligando (Imai C y col. Leukemia 2004 18:676-84; Maher
 J, y col. Nat Biotechnol 2002 20:70-5). El desarrollo general de la tecnología CAR y su uso en la terapia contra el cáncer
 50 se revisa en (Jena y col., Blood 2010, 116(7): 1035-1044).

Por ejemplo, el endodominio del CAR puede diseñarse para comprender el dominio de señalización de CD3ζ por sí mismo
 o combinado con cualquier otro dominio citoplásmico deseado útil en el contexto del CAR de la invención. Por ejemplo,
 el dominio citoplásmico del CAR puede comprender una porción de cadena zeta CD3 y una región de señalización
 55 coestimuladora. La región de señalización coestimuladora se refiere a una porción del CAR que comprende el dominio
 intracelular de una molécula coestimuladora. Una molécula coestimuladora es una molécula de la superficie celular
 distinta de un receptor de antígeno o sus ligandos que se requiere para una respuesta eficiente de los linfocitos a un
 antígeno. Los ejemplos de tales moléculas incluyen CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, ICOS, antígeno
 asociado a la función linfocítica-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 y un ligando que se une específicamente
 60 con CD83 y similares. De acuerdo con una realización particular de la invención, el elemento de señalización
 coestimuladora se selecciona de entre el grupo que consiste en CD28 y 4-1BB.

En algunas realizaciones, el CAR comprende una secuencia de bisagra. Una secuencia de bisagra es una secuencia corta de aminoácidos que facilita la flexibilidad de los anticuerpos (véase, por ejemplo, Woof y col., Nat. Rev. Immunol., 4(2): 89-99 (2004)). La secuencia de la bisagra se puede colocar entre el resto de reconocimiento de antígeno (por ejemplo, un scFv anti-CS1) y el dominio transmembrana. La secuencia de bisagra puede ser cualquier secuencia adecuada derivada u obtenida de cualquier molécula adecuada. En algunas realizaciones, por ejemplo, la secuencia de bisagra se deriva de una molécula CD8a o una molécula CD28.

El dominio transmembrana puede derivarse de una fuente natural o sintética. Cuando la fuente sea natural, el dominio puede derivar de cualquier proteína de unión a la membrana o proteína transmembrana. Por ejemplo, la región transmembrana puede derivarse de (es decir, comprender al menos la(s) región(es) transmembrana) de la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 o CD154. Alternativamente, el dominio transmembrana puede ser sintético, en cuyo caso comprenderá predominantemente residuos hidrófobos tales como leucina y valina. En algunos casos, se encontrará un triplete de fenilalanina, triptófano y valina en cada extremo de un dominio transmembrana sintético. Un enlazador oligo o polipeptídico corto, tal como entre 2 y 10 aminoácidos de longitud, puede formar el enlace entre el dominio transmembrana y el dominio endoplásmico del CAR.

El enlazador bivalente puede ser cualquier molécula adecuada para unir un compuesto o ácido nucleico a una secuencia de polinucleótidos. Los procedimientos y composiciones para conjugar biomoléculas, tales como polinucleótidos, se describen en G.T. Hermanon, Bioconjugate Techniques (2nd ed.), Academic Press (2008). En algunos casos, el enlazador bivalente comprende uno o más aminoácidos. Sin embargo, también puede comprender un enlace peptídico que une directamente los dominios divulgados.

En esta solicitud se divulgan CAR específicos de CS1 que comprenden uno o más de los componentes SP, CS1, HG, TM, CSR, ISD y/o enlazador expuestos en la Tabla 1, o variantes de los mismos que tienen al menos 65 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia con las secuencias expuestas en la Tabla 1.

Tabla 1: Secuencias ejemplares para los diferentes componentes CAR CS1		
Dominios funcionales	SEQ ID #	Secuencia de aminoácidos/secuencia de ácidos nucleicos
SP	SEQ ID NO:1	MGWSSILFLVATATGVH
	SEQ ID NO:2	ATGGGATGGAGCTCTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAA CAGCTACAGGTGTCCAC
CD8α SP	SEQ ID NO:3	MALPVTALLPLALLHAARP
SP alternativo	SEQ ID NO:4	METDTLLLWVLLWVPGSTG
Dominio de bisagra	SEQ ID NO:5	LEPKSCDKHTCTPPCP
	SEQ ID NO:6	CTCGAGCCCAAATCTTGACAAAACACACATGC CCACCGTGCCCG
CD8α TM	SEQ ID NO:7	IYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYC
41BB TM	SEQ ID NO:8	IISFFLALTSTALLFLFLTLRFSV
CD28 TM	SEQ ID NO:9	FWVLVWGGVLACYSLLVTVAFIIFWV
	SEQ ID NO:10	TTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTT GCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTT CTGGGTG
41BB CSR	SEQ ID NO:11	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG GCEL

Tabla 1: Secuencias ejemplares para los diferentes componentes CAR CS1		
Dominios funcionales	SEQ ID #	Secuencia de aminoácidos/secuencia de ácidos nucleicos
CD28 CSR	SEQ ID NO:12	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFA AYRS
	SEQ ID NO:13	AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTAC ATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGGCCACCCGC AAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTC GCAGCCTATCGCTCC
CD3ζ ISD	SEQ ID NO:14	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP PR
	SEQ ID NO:15	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCG TACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTC AATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGAC AAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAA GCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACA ATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACA GTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGC AAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACA GCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAG GCCCTGCCCCCTCGCTAA
Enlazador	SEQ ID NO:16	GGGGSGGGSGGGGS
Luc90 CS1 ScFv	SEQ ID NO:17	SQVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYSFTTYWMN WVKQRPQGQLEWIGMIHPSDSETRLNQKFKDKATLTV DKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYCARSTMIATRAMDY WGQTSVTVSGGGSGGGSGGGSDIVMTQSQKSM STSVGDRVSITCKASQDVITGVAWYQQKPGQSPKLLIY SASYRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISNVQAEDLAVYY CQQHYSSTPLTFGAGTKLELK
	SEQ ID NO:18	TCCCAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTG GTGAGGCCTGGAGCTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAG GCTTCGGGGTACTCCTTCACCACCTACTGGATGAAGT GGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGA TTGGCATGATTATCCTTCCGATAGTGAAACTAGGTT AAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGT AGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAG CAGCCCACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGT GCAAGATCTACTATGATTGCGACGAGGGCTATGGAC TACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCGCGC GGTGGCGGTTCTGGTGGCGGTGGCTCCGGCGGTGGC GGTTCTGACATTGTGATGACCCAGTCTCAGAAATCCA TGTCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCACCT GCAAGGCCAGTCAGGATGTTATTACTGGTGTAGCCT GGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAATTAC TGATTTACTCGGCATCCTACCGGTACACTGGAGTCCC TGATCGCTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACGGATTTC ACTTTCACCATCAGCAATGTGCAGGCTGAAGACCTG GCAGTTTATTACTGTCAGCAACATTATAGTACTCCTC TCACTTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

Tabla 1: Secuencias ejemplares para los diferentes componentes CAR CS1		
Dominios funcionales	SEQ ID #	Secuencia de aminoácidos/secuencia de ácidos nucleicos
Región variable de la cadena ligera Luc90	SEQ ID NO:19	DIVMTQSQKSMSTSVGDRVSITCKASQDVITGVAWYQ QKPGQSPKLLIYSASYRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFTIS NVQAEDLAVYYCQQHYSTPLTFGAGTKLELK
Región variable de la cadena pesada Luc63	SEQ ID NO:20	EVKLLESGGGLVQPGGSLKLSAASGFDFSRYWMSWV RQAPGKGLEWIGEINPDSSTINYTPSLKDKFIISRDNAKN TLYLQMSKVRSEDTALYYCARPDGNYWYFDVWGAGT TVTVSS
Región variable de la cadena ligera Luc63	SEQ ID NO:21	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGIABAWYQ QKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTIS NVQSEDLADYFCQQYSSYPYTFGGGKLEIK
Región variable de la cadena pesada Luc34	SEQ ID NO:22	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTSYWMQW VKQRPQGQLEWIGAIYPGDGDTRYTKQFKGKATLTAD KSSSTAYMQLSSLASEDSAVYYCARGKVYYGSNPFAY WGQGLTVTSA
Región variable de la cadena ligera Luc34	SEQ ID NO:23	DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASDHINNWLAWYQQ KPGNAPRLISGATSLETGVPSPRFSGSGSGKDYTLSTSL QTEDVATYYCQQYWSTPWTFGGGKLEIK
Región variable de la cadena pesada LucXI	SEQ ID NO:24	QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSWMNWV KQRPQGQLEWIGRIYPGDGDTKYNGKFKGKATLTADK SSSTAYMQLSSLTSVDSAVYFCARSTMIATGAMDYWG QGTSVTVS
Región variable de la cadena ligera LucXI	SEQ ID NO:25	ETTVTQSPASLSMAIGEKVTIRCITSTDIDDDMNWYQQ KPGEPKLLISEGNTLRPGVPSRFSSSGYGTDFVTIENM LSEDVADYYCLQSDNLPLTFGGGKLEIK
Región variable de la cadena pesada LucX2	SEQ ID NO:26	QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSWMNWV KQRPQGQLEWIGRIYPGDGDTKYNGKFKGKATLTADK SSSTAYMQLSSLTSVDSAVYFCARSTMIATGAMDYWG QGTSVTVS
Región variable de la cadena ligera LucX2	SEQ ID NO:27	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQ QKPGQSPKLLIYSASYRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISS VQAEDLAVYYCQQHYSTPPYTFGGGKLEIK

Por lo tanto, el CAR específico de CS1 divulgado puede comprender la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 (mostrada a continuación), o una variante de la misma que tiene al menos 65 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 28.

Construcción

CS1-CD28-CD3Z:

MGWSSIILFLVATATGVHSQVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYSFTTYW
 MNWVKQRPGQGLEWIGMIHPSDSETRLNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLS
 SPTSEDSAVYYCARSTMIATRAMDYWGQTSVTVSGGGGSGGGGSGGGGSD
 IVMTQSQKSMSTSVGDRVSITCKASQDVITGVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYR
 YTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISNVQAEDLAVYYCQQHYSTPLTFGAGTKLELK
 LEPKSCDKTHTCPPCPDPKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRL
 LHSYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQ
 NQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM
 AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR (SEQ ID
 NO:28).

Ácidos nucleicos y vectores

- 5 También se divulgan polinucleótidos y vectores de polinucleótidos que codifican los CAR específicos de CS1 divulgados que permiten la expresión de los CAR específicos de CS1 en las células efectoras inmunitarias divulgadas.

Por ejemplo, los CAR específicos de CS1 divulgados están codificados por la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 28 (mostrada a continuación), o una variante de la misma que tiene al menos 65 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 29.

Construcción	PCDH-CS1-scFv-marcador	myc-CD28-CD3zeta	(PCDH-CS1-CAR):
ATGGGATGGAGCTCTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTC			
CACTCCCAGGTCCAACCTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGG			

AGCTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCGGGGTACTCCTTCACCACCTA
 CTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTG
 GCATGATTCATCCTTCCGATAGTGAAACTAGGTAAATCAGAAGTTCAAG
 GACAAGGCCACATTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCA
 ACTCAGCAGCCCCGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGAT
 CTACTATGATTGCGACGAGGGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCA
 GTCACCGTCTCCGGCGGTGGCGGTTCTGGTGGCGGTGGCTCCGGCGGTGG
 CGGTTCTGACATTGTGATGACCCAGTCTCAGAAATCCATGTCCACATCAGT
 AGGAGACAGGGTCAGCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTTATTACTG
 GTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAATTACTGATT
 TACTCGGCATCCTACCGGTACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACTGGCAGT
 GGATCTGGGACGGATTTCACTTTCACCATCAGCAATGTGCAGGCTGAAGA
 CCTGGCAGTTTATTACTGTGAGCAACATTATAGTACTCCTCTCACTTTCGG
 TGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACTCGAGCCCAAATCTTGTGACAAAA
 CTCACACATGCCACCGTGCCCGGATCCCAAATTTTGGGTGCTGGTGGTGG
 TTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTA
 TTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGAATGATG
 AACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTA
 TGCCCCACCACGCGACTTCGAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCA
 GGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAAC
 GAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGAC
 GTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCA
 GGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTAC
 AGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATG
 GCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTT
 CACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA (SEQ ID NO:29).

Las secuencias de ácido nucleico que codifican los CAR divulgados, y las regiones de los mismos, pueden obtenerse usando procedimientos recombinantes conocidos en la materia, tales como, por ejemplo, seleccionando bibliotecas de
 5 células que expresan el gen, derivando el gen de un vector que se sabe que incluye el mismo, o aislando directamente de células y tejidos que lo contienen, usando técnicas estándar. Alternativamente, el gen de interés puede producirse sintéticamente, en lugar de clonarse.

La expresión de ácidos nucleicos que codifican CARs se logra normalmente uniendo operativamente un ácido nucleico
 10 que codifica el polipéptido CAR a un promotor, e incorporando la construcción en un vector de expresión. Los vectores de clonación típicos contienen terminadores de transcripción y traducción, secuencias de iniciación y promotores útiles para la regulación de la expresión de la secuencia de ácido nucleico deseada.

El ácido nucleico divulgado puede clonarse en varios tipos de vectores. Por ejemplo, el ácido nucleico se puede clonar
 15 en un vector que incluye, pero no se limita a un plásmido, un fagémido, un derivado de fago, un virus animal y un cósmido. Los vectores de particular interés incluyen vectores de expresión, vectores de replicación, vectores de generación de sondas y vectores de secuenciación.

Además, el vector de expresión se puede proporcionar a una célula en forma de un vector viral. La tecnología de vectores

virales es bien conocida en la técnica y se describe, por ejemplo, en Sambrook y col. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York), y en otros manuales de virología y biología molecular. Los virus, que son útiles como vectores incluyen, pero no se limitan a, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes y lentivirus. En general, un vector adecuado contiene un origen de replicación funcional en al menos un organismo, una secuencia promotora, sitios de endonucleasa de restricción convenientes y uno o más marcadores seleccionables. Ejemplos de vectores polinucleotídicos son los vectores lentivirales o retrovirales.

Se han desarrollado varios sistemas basados en virus para la transferencia de genes a células de mamíferos. Por ejemplo, los retrovirus proporcionan una plataforma conveniente para los sistemas de administración de genes. Un gen seleccionado puede insertarse en un vector y empaquetarse en partículas retrovirales usando técnicas conocidas en la técnica. El virus recombinante puede aislarse y administrarse a las células del sujeto *in vivo* o *ex vivo*.

Un ejemplo de un promotor adecuado es la secuencia del promotor de citomegalovirus temprano inmediato (CMV). Esta secuencia promotora es una secuencia promotora constitutiva fuerte capaz de conducir altos niveles de expresión de cualquier secuencia polinucleotídica unida operativamente a la misma. Otro ejemplo de un promotor adecuado es el factor de crecimiento de alargamiento-1 α (EF-1 α). Sin embargo, también se pueden usar otras secuencias promotoras constitutivas, que incluyen, pero no se limitan al promotor temprano del virus del simio 40 (SV40), el promotor MND (virus del sarcoma mieloproliferativo), el virus del tumor mamario de ratón (MMTV), promotor de repetición terminal largo (LTR) del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), el promotor MoMuLV, un promotor del virus de la leucemia aviar, un promotor temprano inmediato del virus de Epstein-Barr, un promotor del virus del sarcoma de Rous, así como promotores de genes humanos tales como, pero sin limitarse al promotor de actina, el promotor de miosina, el promotor de hemoglobina y el promotor de creatina quinasa. El promotor puede ser alternativamente un promotor inducible. Los ejemplos de promotores inducibles incluyen, pero no se limitan a, un promotor de metalotionina, un promotor de glucocorticoides, un promotor de progesterona y un promotor de tetraciclina.

Elementos promotores adicionales, por ejemplo, potenciadores, regulan la frecuencia de iniciación transcripcional. Normalmente, estos se encuentran en la región 30-110 pb aguas arriba del sitio de inicio, aunque recientemente se ha demostrado que varios promotores también contienen elementos funcionales aguas abajo del sitio de inicio. El espacio entre los elementos del promotor con frecuencia puede ser flexible, de modo que la función del promotor se conserva cuando los elementos se invierten o se mueven entre sí.

Para evaluar la expresión de un polipéptido CAR o porciones del mismo, el vector de expresión a introducir en una célula también puede contener un gen marcador seleccionable o un gen indicador o ambos para facilitar la identificación y selección de células que se expresan de la población de células pretendidas para ser transfectadas o infectadas a través de vectores virales. En otros aspectos, el marcador seleccionable puede transportarse en un fragmento de ADN separado y usarse en un procedimiento de cotransfección. Tanto los marcadores seleccionables como los genes indicadores pueden estar flanqueados con secuencias reguladoras apropiadas para permitir la expresión en las células huésped. Los marcadores seleccionables útiles incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos.

Los genes indicadores se usan para identificar células potencialmente transfectadas y para evaluar la funcionalidad de secuencias reguladoras. En general, un gen indicador es un gen que no está presente o expresado por el organismo o tejido receptor y que codifica un polipéptido cuya expresión se manifiesta por alguna propiedad fácilmente detectable, por ejemplo, actividad enzimática. La expresión del gen indicador se analiza en un momento adecuado después de que el ADN se haya introducido en las células receptoras. Los genes notificados adecuados pueden incluir genes que codifican luciferasa, beta-galactosidasa, cloranfenicol acetil transferasa, fosfatasa alcalina secretada o el gen de la proteína verde fluorescente. Los sistemas de expresión adecuados son bien conocidos y se pueden preparar usando técnicas conocidas u obtener comercialmente. En general, la construcción con la región de flaqueo mínima 5' que muestra el nivel más alto de expresión del gen indicador se identifica como el promotor. Dichas regiones promotoras pueden estar vinculadas a un gen indicador y usarse para evaluar a los agentes para la capacidad de modular la transcripción dirigida por el promotor.

Los procedimientos de introducción y expresión de genes en una célula son conocidos en la técnica. En el contexto de un vector de expresión, el vector puede introducirse fácilmente en una célula huésped, por ejemplo, células de mamífero, bacterianas, de levadura o de insectos mediante cualquier procedimiento en la técnica. Por ejemplo, el vector de expresión se puede transferir a una célula huésped por medios físicos, químicos o biológicos.

Los procedimientos físicos para introducir un polinucleótido en una célula huésped incluyen precipitación con fosfato de calcio, lipofección, bombardeo de partículas, microinyección, electroporación y similares. Los procedimientos para producir células que comprenden vectores y/o ácidos nucleicos exógenos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook y col. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York).

Los métodos biológicos para introducir un polinucleótido de interés en una célula huésped incluyen el uso de vectores de ADN y ARN. Los vectores virales, y especialmente los vectores retrovirales, se han convertido en el procedimiento más

utilizado para insertar genes en mamíferos, por ejemplo, células humanas.

Los medios químicos para introducir un polinucleótido en una célula huésped incluyen sistemas de dispersión coloidal, como complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Un sistema coloidal ejemplar para su uso como vehículo de administración in vitro e in vivo es un liposoma (por ejemplo, una vesícula de membrana artificial).

En el caso de que se use un sistema de administración no viral, un vehículo de administración ejemplar es un liposoma. En otro aspecto, el ácido nucleico puede estar asociado con un lípido. El ácido nucleico asociado con un lípido se puede encapsular en el interior acuoso de un liposoma, intercalado dentro de la bicapa lipídica de un liposoma, unido a un liposoma a través de una molécula de enlace que está asociada tanto con el liposoma como con el oligonucleótido, atrapado en un liposoma, complejoado con un liposoma, dispersado en una solución que contiene un lípido, mezclado con un lípido, combinado con un lípido, contenido como una suspensión en un lípido, contenido o complejoado con una micela, o asociado con un lípido. Las composiciones asociadas a lípidos, lípidos/ADN o lípidos/vectores de expresión no se limitan a ninguna estructura particular en solución. Por ejemplo, pueden estar presentes en una estructura de doble capa, como micelas, o con una estructura "colapsada". También pueden simplemente intercalarse en una solución, posiblemente formando agregados que no son uniformes en tamaño o forma. Los lípidos son sustancias grasas que pueden ser lípidos naturales o sintéticos. Por ejemplo, los lípidos incluyen las gotas de grasa que ocurren de manera natural en el citoplasma, así como la clase de compuestos que contienen hidrocarburos alifáticos de cadena larga y sus derivados, como ácidos grasos, alcoholes, aminas, aminoalcoholes y aldehídos. Los lípidos adecuados para su uso pueden obtenerse de fuentes comerciales. Por ejemplo, se puede obtener dimiristil fosfatidilcolina ("DMPC") de Sigma, St. Louis, Mo.; fosfato de dicetilo ("DCP") se puede obtener de K & K Laboratories (Plainview, NY); colesterol ("Choi") se puede obtener de Calbiochem-Behring; dimiristil fosfatidilglicerol ("DMPG") y otros lípidos se pueden obtener de Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, Ala.).

25 **Células efectoras inmunitarias**

También se divulgan células efectoras inmunitarias que están diseñadas para expresar los CAR descritos. Estas células se obtienen preferentemente del sujeto a tratar (es decir, son autólogas). Sin embargo, también se pueden usar estirpes celulares efectoras inmunitarias o células efectoras donantes (alógenas). Las células efectoras inmunitarias se pueden obtener, por ejemplo, de varias fuentes, incluyendo células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de ganglios linfáticos, sangre de cordón umbilical, tejido del timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, efusión pleural, tejido del bazo y tumores. Las células efectoras inmunitarias pueden obtenerse a partir de sangre extraída de un sujeto usando cualquier número de técnicas conocidas por los expertos en la materia, tales como la separación de Ficoll™. Por ejemplo, las células de la sangre circulante de un individuo pueden obtenerse por aféresis. Las células efectoras inmunitarias pueden aislarse de los linfocitos de sangre periférica al lisar los glóbulos rojos y agotar los monocitos, por ejemplo, mediante centrifugación a través de un gradiente PERCOLL™ o mediante elutriación centrífuga de contraflujo. Una subpoblación específica de células efectoras inmunitarias puede aislarse adicionalmente mediante técnicas de selección positiva o negativa. Por ejemplo, las células efectoras inmunitarias pueden aislarse usando una combinación de anticuerpos dirigidos a marcadores de superficie únicos para las células seleccionadas positivamente, por ejemplo, mediante incubación con microesferas conjugadas con anticuerpos durante un período de tiempo suficiente para la selección positiva de las células efectoras inmunitarias deseadas. Alternativamente, el enriquecimiento de la población de células efectoras inmunitarias se puede lograr mediante selección negativa usando una combinación de anticuerpos dirigidos a marcadores de superficie únicos para las células seleccionadas negativamente.

Las células efectoras inmunitarias pueden comprender cualquier leucocito involucrado en la defensa del cuerpo contra enfermedades infecciosas y materiales extraños. Por ejemplo, las células efectoras inmunitarias pueden comprender linfocitos, monocitos, macrófagos, células dentríticas, mastocitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos o cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, las células efectoras inmunitarias pueden comprender linfocitos T.

Las células T o los linfocitos T se pueden distinguir de otros linfocitos, como las células B y las células asesinas naturales (células NK), por la presencia de un receptor de células T (TCR) en la superficie celular. Se llaman células T porque maduran en el timo (aunque algunas también maduran en las amígdalas). Existen varios subconjuntos de linfocitos T, cada uno con una función distinta.

Las células T auxiliares (células T_H) ayudan a otros glóbulos blancos en los procesos inmunológicos, incluida la maduración de células B en células plasmáticas y células B de memoria, y la activación de células T citotóxicas y macrófagos. Estas células también se conocen como células T CD4+ porque expresan la glicoproteína CD4 en su superficie. Las células T auxiliares se activan cuando las moléculas MHC de clase II las presentan con antígenos peptídicos, que se expresan en la superficie de las células presentadoras de antígenos (APC). Una vez se activan, se dividen rápidamente y secretan pequeñas proteínas llamadas citocinas que regulan o ayudan en la respuesta inmunitaria activa. Estas células pueden diferenciarse en uno de varios subtipos, incluyendo T_H1, T_H2, T_H3, T_H17, T_H9 o T_{FF}, que

secretan diferentes citocinas para facilitar un tipo diferente de respuesta inmunitaria.

- Las células T citotóxicas (células T_C o CTL) destruyen las células infectadas por virus y las células tumorales, y también están implicadas en el rechazo de trasplantes. Estas células también se conocen como células T CD8⁺ ya que expresan la glicoproteína CD8 en su superficie. Estas células reconocen sus dianas al unirse al antígeno asociado con las moléculas de MHC de clase I, que están presentes en la superficie de todas las células nucleadas. A través de la IL-10, la adenosina y otras moléculas secretadas por las células T reguladoras, las células CD8⁺ pueden inactivarse a un estado anérgico, lo que previene enfermedades autoinmunitarias.
- 10 Las células T de memoria son un subconjunto de células T específicas de antígeno que persisten a largo plazo después de que remita una infección. Se expanden rápidamente a un gran número de células T efectoras al volver a exponerse a su antígeno afín, proporcionando así al sistema inmunitario "memoria" contra infecciones pasadas. Las células de memoria pueden ser CD4⁺ o CD8⁺. Las células T de memoria normalmente expresan la proteína de superficie celular CD45RO.
- 15 Las células T reguladoras (células T_{reg}), anteriormente conocidas como células T supresoras, son cruciales para el mantenimiento de la tolerancia inmunológica. Su función principal es suprimir la inmunidad mediada por células T hacia el final de una reacción inmunitaria y suprimir las células T autorreactivas que escaparon al proceso de selección negativa en el timo. Dos clases principales de células T_{reg} CD4⁺ han sido descritas - células T_{reg} naturales y células T_{reg} adaptativas.
- 20 Los linfocitos T citotóxicos (NKT) (que no deben confundirse con las células asesinas naturales (NK)) unen el sistema inmunitario adaptativo con el sistema inmunitario innato. A diferencia de las células T convencionales que reconocen los antígenos peptídicos presentados por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), las células NKT reconocen el antígeno glicolipídico presentado por una molécula llamada CD1d.
- 25 Las células T pueden comprender una mezcla de células CD4⁺. Las células T también pueden enriquecerse para uno o más subconjuntos en función de la expresión de la superficie celular. Por ejemplo, en algunos casos, las células T comprenden linfocitos T citotóxicos CD8⁺. En algunos casos, las células T comprenden células T γδ, que poseen un receptor distinto de células T (TCR) que tiene una cadena γ y una cadena δ en lugar de cadenas α y β.
- 30 Las células citolíticas (NK) son linfocitos granulares grandes CD56⁺CD3⁻ que pueden destruir células infectadas y transformadas viralmente, y constituyen un subconjunto celular crítico del sistema inmunitario innato (Godfrey J, y col. Leuk Lymphoma 2012 53:1666-1676). A diferencia de linfocitos T citotóxicos CD8⁺, las células NK lanzan citotoxicidad contra las células tumorales sin el requisito de sensibilización previa, y también pueden erradicar las células negativas para MHC-I (Narni-Mancinelli E, y col. Int Immunol 2011 23:427-431). Las células NK son células efectoras más seguras, ya que pueden evitar las complicaciones potencialmente letales de las tormentas de citocinas (Morgan RA, y col. Mol Ther 2010 18:843-851), síndrome de lisis tumoral (Porter DL y col. N Engl J Med 2011 365:725-733), y efectos sobre la diana, fuera del tumor. Aunque las células NK tienen un papel bien conocido como destructoras de células cancerígenas, y el deterioro de las células NK ha sido ampliamente documentado como crucial para la progresión de MM (Godfrey J, y col. Leuk Lymphoma 2012 53:1666-1676; Fauriat C, y col. Leukemia 2006 20:732-733), los medios por los cuales se podría mejorar la actividad anti-MM mediada por células NK no se han explorado en gran medida antes de los CAR divulgados.
- 40

Métodos terapéuticos

- 45 Las células efectoras inmunitarias que expresan los CAR divulgados pueden provocar una respuesta inmunitaria antitumoral contra células MM. La respuesta inmunitaria antitumoral provocada por las células efectoras inmunitarias modificadas con CAR divulgadas puede ser una respuesta inmunitaria activa o pasiva. Además, la respuesta inmunitaria mediada por CAR puede ser parte de una estrategia de inmunoterapia adoptiva en el que las células efectoras inmunitarias modificadas con CAR inducen una respuesta inmunitaria específica para CS1.
- 50 La transferencia adoptiva de células efectoras inmunitarias que expresan receptores de antígeno quimérico es un prometedor tratamiento anticancerígeno. Después de la recogida de las células efectoras inmunitarias de un paciente, las células pueden ser genomanipuladas para expresar los CAR específicos de CS1 divulgados, luego infundidas nuevamente en el paciente.
- 55 Las células efectoras inmunitarias modificadas con CAR divulgadas pueden administrarse solas o como una composición farmacéutica en combinación con diluyentes y/o con otros componentes tales como IL-2, IL-15 u otras citocinas o poblaciones celulares. En resumen, las composiciones farmacéuticas pueden comprender una población de células diana como se describe en esta solicitud, en combinación con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéutica o fisiológicamente aceptables. Dichas composiciones pueden comprender tampones tales como solución salina tamponada neutra, solución salina tamponada con fosfato y similares; carbohidratos tales como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos tales como glicina; antioxidantes; agentes quelantes tales como
- 60

EDTA o glutatión; adyuvantes (por ejemplo, hidróxido de aluminio); y conservantes. Las composiciones para usar en los procedimientos divulgados están en algunas realizaciones formuladas para administración intravenosa. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse de cualquier manera adecuada para tratar MM. La cantidad y la frecuencia de la administración estarán determinadas por factores tales como el estado del paciente y la gravedad de la enfermedad del paciente, aunque los ensayos clínicos pueden determinar las dosificaciones apropiadas.

- 5 Cuando se indica "una cantidad inmunológicamente efectiva", "una cantidad efectiva antitumoral", "una cantidad efectiva inhibidora de tumores" o "cantidad terapéutica", se puede determinar la cantidad precisa de las composiciones de la presente invención a administrar por un médico con consideración de las diferencias individuales en edad, peso, tamaño del tumor, extensión de la infección o metástasis, y condición del paciente (sujeto). Generalmente se puede afirmar que una composición farmacéutica que comprende las células T descritas en esta solicitud se puede administrar a una dosificación de 10^4 a 10^9 células/kg de peso corporal, como 10^5 a 10^6 células/kg de peso corporal, incluidos todos los valores enteros dentro de esos intervalos. Las composiciones de células T también se pueden administrar múltiples veces a estas dosificaciones. Las células pueden administrarse mediante el uso de técnicas de infusión que se conocen comúnmente en inmunoterapia (véase, por ejemplo, Rosenberg y col., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988). La dosificación óptima y el régimen de tratamiento para un paciente en particular se pueden determinar fácilmente por un experto en la materia de la medicina al monitorear al paciente para detectar signos de enfermedad y ajustar el tratamiento en consecuencia.
- 10 Puede desearse administrar células T activadas a un sujeto y luego volver a extraer sangre (o realizar una aféresis), activar las células T a partir de ellas de acuerdo con los procedimientos divulgados y reinfundir al paciente con estas células T activadas y expandidas. Este proceso puede llevarse a cabo varias veces cada pocas semanas. En ciertos casos, las células T pueden activarse a partir de extracciones de sangre de 10 cc a 400 cc. En ciertos casos, las células T se activan a partir de extracciones de sangre de 20 cc, 30 cc, 40 cc, 50 cc, 60 cc, 70 cc, 80 cc, 90 cc o 100 cc. El uso de este protocolo de extracción de sangre múltiple/reinfusión múltiple puede servir para seleccionar ciertas poblaciones de células T.

- La administración de las composiciones divulgadas se puede llevar a cabo de cualquier manera conveniente, incluyendo inyección, transfusión o implantación. Las composiciones descritas en esta solicitud pueden administrarse a un paciente por vía subcutánea, intradérmica, intratumoral, intranodal, intramedular, intramuscular, mediante inyección intravenosa (i.v.) o intraperitoneal. En algunos casos, las composiciones divulgadas se administran a un paciente mediante inyección intradérmica o subcutánea. En algunos casos, las composiciones divulgadas se administran por inyección i.v. Las composiciones también pueden inyectarse directamente en un tumor, ganglio linfático o sitio de infección.
- 30 En ciertos casos, las células efectoras inmunitarias modificadas con CAR divulgadas se administran a un paciente junto con (por ejemplo, antes, simultáneamente o después) cualquier número de modalidades de tratamiento relevantes, que incluyen pero no se limitan a talidomida, dexametasona, bortezomib y lenalidomida. En otros casos, las células efectoras inmunitarias modificadas con CAR pueden usarse en combinación con quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos u otros agentes inmunoablativos como CAM PATH, anticuerpos anti-CD3 u otras terapias de anticuerpos, citoxina, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228, citocinas e irradiación. En algunos casos, las células efectoras inmunitarias modificadas con CAR se administran a un paciente junto con (por ejemplo, antes, simultáneamente o después) el trasplante de médula ósea, la terapia ablativa de células T usando agentes quimioterapéuticos como fludarabina, radioterapia de haz externo (XRT), ciclofosfamida o anticuerpos como OKT3 o CAMPATH. En otro caso, las composiciones celulares de la presente invención se administran después de una terapia ablativa de células B tal como agentes que reaccionan con CD20, por ejemplo, Rituxan. Por ejemplo, en algunos casos, los sujetos pueden someterse a un tratamiento estándar con quimioterapia de dosis alta seguida de trasplante de células madre de sangre periférica. En ciertos casos, después del trasplante, los sujetos reciben una infusión de las células inmunitarias expandidas de la presente invención. En un caso adicional, las células expandidas se administran antes o después de la cirugía.

Definiciones

- La expresión "secuencia de aminoácidos" se refiere a una lista de abreviaturas, letras, caracteres o palabras que representan residuos de aminoácidos. Las abreviaturas de aminoácidos usadas en esta solicitud son códigos convencionales de una letra para los aminoácidos y se expresan de la siguiente manera: A, alanina; B, asparagina o ácido aspártico; C, cisteína; D ácido aspártico; E, glutamato, ácido glutámico; F, fenilalanina; G, glicina; H histidina; I, isoleucina; K, lisina; L, leucina; M, metionina; N, asparagina; P, prolina; Q, glutamina; R, arginina; S, serina; T, treonina; V, valina; W, triptófano; Y, tirosina; Z, glutamina o ácido glutámico.
- 60 El término "anticuerpo" se refiere a anticuerpos naturales o sintéticos que se unen selectivamente a un antígeno diana. El término incluye anticuerpos policlonales y monoclonales. Además de las moléculas de inmunoglobulina intactas, también se incluyen en el término "anticuerpos" fragmentos o polímeros de esas moléculas de inmunoglobulina, y versiones

humanas o humanizadas de moléculas de inmunoglobulina que se unen selectivamente al antígeno diana.

El término "aptámero" se refiere a moléculas de ácido oligonucleico o péptido que se unen a una molécula diana específica. Estas moléculas generalmente se seleccionan de entre un grupo de secuencias aleatorias. Los aptámeros seleccionados son capaces de adaptar estructuras terciarias únicas y reconocer moléculas diana con alta afinidad y especificidad. Un "aptámero de ácido nucleico" es un ácido oligonucleico de ADN o ARN que se une a una molécula diana a través de su conformación, y por lo tanto inhibe o suprime las funciones de dicha molécula. Un aptámero de ácido nucleico puede estar constituido por ADN, ARN o una combinación de los mismos. Un "aptámero peptídico" es una molécula de proteína combinatoria con una secuencia peptídica variable insertada dentro de una proteína de armazón constante. La identificación de aptámeros peptídicos se realiza normalmente en condiciones estrictas de dihíbrido de levadura, lo que aumenta la probabilidad de que los aptámeros peptídicos seleccionados se expresen de forma estable y se plieguen correctamente en un contexto intracelular.

El término "vehículo" significa un compuesto, composición, sustancia o estructura que, cuando se combina con un compuesto o composición, ayuda o facilita la preparación, almacenamiento, administración, entrega, efectividad, selectividad o cualquier otra característica del compuesto o composición para su uso o propósito previsto. Por ejemplo, se puede seleccionar un vehículo para minimizar cualquier degradación del principio activo y minimizar cualquier efecto secundario adverso en el sujeto.

La expresión "molécula quimérica" se refiere a una molécula única creada uniendo dos o más moléculas que existen por separado en su estado nativo. La molécula quimérica individual tiene la funcionalidad deseada de todas sus moléculas constituyentes. Un tipo de moléculas quiméricas es una proteína de fusión.

La expresión "proteína de fusión" se refiere a un polipéptido formado por la unión de dos o más polipéptidos a través de un enlace peptídico formado entre el extremo amino-terminal de un polipéptido y el extremo carboxilo-terminal de otro polipéptido. La proteína de fusión puede formarse mediante el acoplamiento químico de los polipéptidos constituyentes o puede expresarse como un polipéptido único a partir de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión contigua única. Una proteína de fusión de cadena sencilla es una proteína de fusión que tiene un esqueleto de polipéptido contiguo único. Las proteínas de fusión se pueden preparar usando técnicas convencionales en biología molecular para unir los dos genes en el marco en un solo ácido nucleico, y luego expresar el ácido nucleico en una célula huésped apropiada en condiciones en las que se produce la proteína de fusión.

El término "identidad" se refiere a la identidad de secuencia entre dos moléculas de ácido nucleico o polipéptidos. La identidad se puede determinar comparando una posición en cada secuencia que se puede alinear para fines de comparación. Cuando una posición en la secuencia comparada está ocupada por la misma base, las moléculas son idénticas en esa posición. Un grado de similitud o identidad entre las secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos es una función del número de nucleótidos idénticos o coincidentes en las posiciones compartidas por las secuencias de ácido nucleico. Se pueden usar varios algoritmos y/o programas de alineación para calcular la identidad entre dos secuencias, incluyendo FASTA o BLAST, que están disponibles como parte del paquete de análisis de secuencia GCG (Universidad de Wisconsin, Madison, Wis.), y se pueden usar con, por ejemplo, la configuración predeterminada. Por ejemplo, se contemplan polipéptidos que tienen al menos 70 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de identidad con polipéptidos específicos descritos en esta invención y que exhiben preferentemente sustancialmente las mismas funciones, así como el polinucleótido que codifica dichos polipéptidos. A menos que se indique lo contrario, una puntuación de similitud se basará en el uso de BLOSUM62. Cuando se usa BLASTP, el porcentaje de similitud se basa en la puntuación positiva de BLASTP y el porcentaje de identidad de secuencia se basa en la puntuación de identidad de BLASTP. "Identities" de BLASTP muestra el número y la fracción de residuos totales en los pares de secuencia de alta puntuación que son idénticos; y "Positivos" de BLASTP muestra el número y la fracción de residuos para los que las puntuaciones de alineación tienen valores positivos y que son similares entre sí. Las secuencias de aminoácidos que tienen estos grados de identidad o similitud o cualquier grado intermedio de identidad de similitud con las secuencias de aminoácidos divulgadas en esta solicitud se contemplan y abarcan en esta divulgación. Las secuencias de polinucleótidos de polipéptidos similares se deducen usando el código genético y pueden obtenerse por medios convencionales, en particular traduciendo inversamente su secuencia de aminoácidos usando el código genético.

La expresión "ácido nucleico" se refiere a una molécula natural o sintética que comprende un solo nucleótido o dos o más nucleótidos unidos por un grupo fosfato en la posición 3' de un nucleótido al extremo 5' de otro nucleótido. El ácido nucleico no está limitado por la longitud y, por lo tanto, el ácido nucleico puede incluir ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN).

La expresión "operativamente unido a" se refiere a la relación funcional de un ácido nucleico con otra secuencia de ácido nucleico. Los promotores, potenciadores, sitios de parada transcripcionales y traduccionales, y otras secuencias señal son ejemplos de secuencias de ácido nucleico unidas operativamente a otras secuencias. Por ejemplo, el enlace operable de ADN a un elemento de control transcripcional se refiere a la relación física y funcional entre el ADN y el promotor de

tal manera que la transcripción de dicho ADN se inicia desde el promotor mediante una ARN polimerasa que reconoce, se une y transcribe específicamente.

Los términos "péptido", "proteína" y "polipéptido" se usan indistintamente para referirse a una molécula natural o sintética que comprende dos o más aminoácidos unidos por el grupo carboxilo de un aminoácido al grupo alfa amino de otro.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que, según el alcance del criterio médico sensato, son adecuados para su uso en contacto con tejidos humanos y animales sin provocar una toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otros problemas o complicaciones, con una relación beneficio/riesgo acorde razonable.

La expresión "dominio de proteína" se refiere a una porción de una proteína, porciones de una proteína o una proteína completa que muestra integridad estructural; esta determinación puede basarse en la composición de aminoácidos de una porción de una proteína, porciones de una proteína o la proteína completa.

Un "espaciador", como se usa en esta solicitud, se refiere a un péptido que se une a las proteínas que comprenden una proteína de fusión. Generalmente, un espaciador no tiene actividad biológica específica más que unir las proteínas o preservar una distancia mínima u otra relación espacial entre ellas. Sin embargo, los aminoácidos constituyentes de un espaciador pueden seleccionarse para influir en alguna propiedad de la molécula, como el plegamiento, la carga neta o la hidrofobicidad de la molécula.

La expresión "se une específicamente", como se usa en esta solicitud, cuando se refiere a un polipéptido (incluidos anticuerpos) o receptor, se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína o polipéptido o receptor en una población heterogénea de proteínas y otros productos biológicos. Por lo tanto, bajo condiciones designadas (por ejemplo, condiciones de inmunoensayo en el caso de un anticuerpo), un ligando o anticuerpo específico "se une específicamente" a su "diana" particular (por ejemplo, un anticuerpo se une específicamente a un antígeno endotelial) cuando no se une en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra o a otras proteínas con las que el ligando o anticuerpo pueden entrar en contacto en un organismo. Generalmente, una primera molécula que "se une específicamente" a una segunda molécula tiene una constante de afinidad (K_a) mayor que aproximadamente $10^5 M^{-1}$ (por ejemplo., $10^6 M^{-1}$, $10^7 M^{-1}$, $10^8 M^{-1}$, $10^9 M^{-1}$, $10^{10} M^{-1}$, $10^{11} M^{-1}$, y $10^{12} M^{-1}$ o más) con esa segunda molécula.

La expresión "administrar específicamente", como se usa en esta solicitud, se refiere a la asociación preferencial de una molécula con una célula o tejido que lleva una molécula o marcador diana particular y no a células o tejidos que carecen de esa molécula diana. Por supuesto, se reconoce que puede ocurrir un cierto grado de interacción no específica entre una molécula y una célula o tejido no diana. Sin embargo, la administración específica puede distinguirse como mediada a través del reconocimiento específico de la molécula diana. Normalmente, la administración específica da como resultado una asociación mucho más fuerte entre la molécula administrada y las células que llevan la molécula diana que entre la molécula administrada y las células que carecen de la molécula diana.

El término "sujeto" se refiere a cualquier individuo que es la diana de la administración o el tratamiento. El sujeto puede ser un vertebrado, por ejemplo, un mamífero. Por lo tanto, el sujeto puede ser un paciente humano o veterinario. El término "paciente" se refiere a un sujeto bajo el tratamiento de un médico, por ejemplo, un doctor.

La expresión "terapéuticamente efectivo" se refiere a la cantidad de la composición usada que es de cantidad suficiente para mejorar una o más causas o síntomas de una enfermedad o trastorno. Dicha mejora solo requiere una reducción o alteración, no necesariamente una eliminación.

Los términos "transformación" y "transfección" significan la introducción de un ácido nucleico, por ejemplo, un vector de expresión, en una célula receptora que incluye la introducción de un ácido nucleico en el ADN cromosómico de dicha célula.

El término "tratamiento" se refiere al manejo médico de un paciente con la intención de curar, mejorar, estabilizar o prevenir una enfermedad, afección patológica o trastorno. Este término incluye el tratamiento activo, es decir, tratamiento dirigido específicamente a la mejora de una enfermedad, afección patológica o trastorno, y también incluye el tratamiento causal, es decir, tratamiento dirigido a eliminar la causa de la enfermedad, afección patológica o trastorno asociados. Asimismo, este término incluye el tratamiento paliativo, es decir, tratamiento diseñado para el alivio de los síntomas en vez de la cura de la enfermedad, afección patológica o trastorno; tratamiento preventivo, es decir, tratamiento dirigido a minimizar o inhibir parcial o completamente el desarrollo de la enfermedad, afección patológica o trastorno asociados; y tratamiento de apoyo, es decir, tratamiento empleado para complementar otra terapia específica dirigida a la mejora de la enfermedad, afección patológica o trastorno asociados.

El término "variante" se refiere a una secuencia de aminoácidos o péptidos que tiene sustituciones de aminoácidos

conservativas, sustituciones de aminoácidos no conservativas (es decir, una variante degenerada), sustituciones dentro de la posición de oscilación de cada codón (es decir, ADN y ARN) que codifica un aminoácido, aminoácidos añadidos al término C-terminal de un péptido, o un péptido que tiene 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de referencia.

El término "vector" se refiere a una secuencia de ácido nucleico capaz de transportar a una célula otro ácido nucleico al que se ha unido la secuencia del vector. La expresión "vector de expresión" incluye cualquier vector (por ejemplo, un plásmido, un cósmido o un cromosoma de fago) que contiene una construcción génica en una forma adecuada para la expresión de una célula (por ejemplo, unida a un elemento de control transcripcional).

EJEMPLOS

Ejemplo 1: La modificación genética de las células T redirigidas hacia CS1 mejora la erradicación de las células de mieloma

En el presente estudio, las células T fueron manipuladas para expresar un CAR específico de CS1 que incorpora restos de señalización CD28-CD3ζ, lo que demuestra que las células T CAR específicas de CS1 median la liberación mejorada de citocina y la citotoxicidad en respuesta a las células de mieloma que expresan CS1, que ocurrió de una manera dependiente de CS1. Además, en modelos xenoinjertos murinos ortotópicos MM, las células T redirigidas a CS1 erradicaron eficazmente las células de mieloma humano y prolongaron significativamente la supervivencia del ratón. En conjunto, estos datos sugieren que la terapia adoptiva con células T armadas con un CAR específico de CS1 representa una estrategia prometedora contra la recaída de MM.

Materiales y procedimientos

Cultivo celular

Las estirpes celulares de mieloma múltiple humano IM9, NCI-H929, MM.1S y RPMI-8226 se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), y se mantuvieron en medio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado con suero bovino fetal al 10 % (FBS) (Invitrogen). Las células de empaquetamiento 293T y Phoenix se cultivaron en medio DMEM (Invitrogen) con FBS al 10 %. Las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) de donantes sanos y pacientes con mieloma múltiple se aislaron mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA), y los monocitos se agotaron por adherencia plástica. Las células de mieloma primario CD138⁺ se seleccionaron positivamente de los aspirados de médula ósea de pacientes que usan MicroBeads anti-CD138 humanos y clasificación celular asistida por imán (MACS, Miltenyi Biotec), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se obtuvo el consentimiento informado de pacientes con mieloma de acuerdo con un protocolo aprobado por la Junta de Revisión Institucional de la Universidad Estatal de Ohio.

Ratones

Se obtuvieron ratones macho NOD-scid IL-2Rgamma nulo (NSG) macho de seis a 8 semanas de edad del Laboratorio Jackson. Los ratones fueron monitoreados con frecuencia para detectar la progresión de la enfermedad de MM, y se sacrificaron cuando se volvieron moribundos con los síntomas de parálisis de las extremidades posteriores, letargo o pérdida de peso evidente. Todo el trabajo con animales fue aprobado por el Comité de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad Estatal de Ohio.

Generación de la construcción retroviral CAR específica de CS1

El scFv anti-CS1 se derivó de la estirpe celular de hibridoma Luc90. Las secuencias de dominio de codificación para regiones variables de cadena pesada (V_H) y ligera (V_L) se amplificaron por separado y se recombinaron usando un enlazador superponiendo la reacción de PCR. El fragmento V_H-enlazador-V_L se incorporó en el marco con la porción CD28-CD3ζ. Todo el fragmento anti-CS1-scFv-CD28-CD3ζ se ligó en un vector retroviral designado Pinco (Yu J, y col. Immunity 2006 24:575-90; Becknell B y col. J Immunol Methods 2005 296:115-23) para generar una construcción Pinco-CS1-CAR.

Transducción retroviral de linfocitos T

Se recogieron sobrenadantes retrovirales de células de empaquetamiento de Phoenix transfectadas transitoriamente con la construcción Pinco o Pinco-CS1-CAR durante 48 h, como se describió anteriormente (Becknell B y col. J Immunol Methods. 2005 296(1-2):115-123; Yu J, y col. Immunity. 2006 24(5):575-590). Las PBMC se cultivaron en medio RPMI 1640 con FBS al 10 % y se estimularon con Dynabeads CD3/CD28 de Activador T humano (Invitrogen) y 150 UI/ml de interleucina-2 recombinante humana (IL-2, Hoffman-La Roche Inc.) durante 2 días. Luego, las células se resuspendieron

en sobrenadantes infecciosos y se aplicaron en placas de 6 pocillos tratadas con cultivo sin tejidos recubiertas con RETRONECTINA (Clontech Laboratories) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El proceso de infección se repitió una vez en el segundo día. Luego, las células se transfirieron a matraces tratados con cultivo de tejidos y se mantuvieron en presencia de 150 UI/ml de IL-2. Las células T transducidas se purificaron usando un clasificador de células FACSARIA II (BD Biosciences) basado en la expresión de un marcador de GFP en la superficie celular codificado por el vector Pinco.

Análisis de citometría de flujo.

Para la detección de la expresión de CS1-CAR en la superficie celular, las células T transducidas se lavaron con PBS que contenía albúmina de suero bovino al 4 %, y se incubaron con anticuerpo policlonal de cabra anti-ratón (Fab)2 marcado con biotina o anticuerpo de inmunoglobulina G (IgG) de cabra policlonal normal (Jackson ImmunoResearch) como control de isotipo. Luego, las células se tiñeron con estreptavidina conjugada con alofococianina (APC) (Jackson ImmunoResearch) y anticuerpo anti-CD3 conjugado con V450 (BD Biosciences). Para determinar la expresión de CS1 en la superficie de las células de mieloma, las células se tiñeron con mAb anti-CS1 de ratón conjugado con ficoeritrina (PE) (eBiosciences) y mAb anti-CD138 de ratón conjugado con APC (Miltényi Biotec). La tinción de anticuerpos se controló con un citómetro de flujo BD LSR II. El análisis de los datos se realizó con el software FLOWJO (Tree Star Inc.)

Inmunoelectrotransferencia

Las células se lisaron en tampón laemmli. Los lisados se separaron mediante gel SDS-PAGE y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa (Millipore). La membrana se sondeó con mAb anti-CD3ζ humano de ratón (BD Pharmingen) y luego con un anticuerpo de IgG anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante. La unión de anticuerpos se reveló usando un reactivo de quimioluminiscencia mejorado (GE Healthcare Biosciences).

25 Generación de células RPMI-8226 que expresan CS1 de manera estable

La secuencia de codificación CS1 humana de longitud completa se amplificó por PCR a partir del ADNc de IM9, y se insertó en un vector lentiviral designado PCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP (PCDH, System Biosciences), produciendo PCDH-CS1. Para producir lentivirus, las células 293T se co-transfectaron con el plásmido PCDH-CS1 o un plásmido vector PCDH vacío más los plásmidos de empaquetamiento pCMV-VSVG y pCMV-dr9 usando el reactivo de transfección de fosfato de calcio (Promega). Luego, se recogieron los sobrenadantes lentivirales y se usaron para infectar células RPMI-8226 usando un protocolo publicado previamente (Becknell B y col. J Immunol Methods. 2005 296(1-2):115-123; Yu J, y col. Immunity. 2006 24(5): 575-590).

35 Ensayo de citotoxicidad

Un ensayo de liberación ^{51}Cr estándar de 4 horas se realizó como se describió anteriormente (Yu J, y col. Blood 2010 115:274-81). Brevemente, las células diana se marcaron con ^{51}Cr y co-cultivaron con células T en diversas relaciones efector/diana (E/T) en los pocillos de la placa de fondo V de 96 pocillos a 37 °C durante 4 horas. Los sobrenadantes se recogieron y se transfirieron a viales de centelleo que contenían un cóctel de centelleo líquido (Fisher Scientific), y la liberación de ^{51}Cr se midió en el contador TOPCOUNT (Canberra Packard). Las células diana incubadas en medio completo o SDS al 1 % se usaron para determinar la liberación de ^{51}Cr espontánea o máxima. El porcentaje de lisis específica se calculó usando la fórmula estándar: $100 \times (\text{liberación experimental cpm} - \text{liberación espontánea cpm}) / (\text{liberación máxima cpm} - \text{liberación espontánea cpm})$.

Ensayos de liberación de citocinas

Las células diana se co-cultivaron con un número igual de células efectoras en placas de fondo en V de 96 pocillos a 37 °C durante 24 horas. Los sobrenadantes libres de células fueron recogidos y evaluados para la secreción de IFN-γ e interleucina (IL)-2 por ELISA usando los kits de ELISA correspondientes del sistema de R&D de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Ensayo de desgranulación CD107a

El ensayo CD107a se realizó como se describió anteriormente con alguna modificación (He S y col. Blood 2013 121:4663-71). Brevemente, las células diana MM ($2,5 \times 10^5$) se co-cultivaron con un número igual de células efectoras en 0,2 ml por pocillo en placas con fondo en V de 96 pocillos. Las células de control son células T simuladas o transducidas con CS1-CAR incubadas sin células diana. Se añadió anticuerpo de isotipo anti-CD 107a o IgG1 conjugado con APC (BD Biosciences) junto con 1 ml de monensina (BD Biosciences) y se incubó a 37 °C durante 4 horas. Las células se tiñeron adicionalmente con anticuerpos CD69 conjugados con PE y CD3 conjugados con V450, y se analizaron usando un citómetro de flujo LSR II (BD Biosciences).

Tinción intracelular de granzima Band y perforina

Las células T simuladas o transducidas con CS1-CAR se lavaron y se tiñeron con mAb anti-CD3 humano conjugado con V450. Posteriormente, las células se fijaron y se permeabilizaron usando el kit Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences), marcado con anti-granzima B conjugada con APC (Invitrogen), anticuerpo anti-perforina conjugado con APC (eBiosciences) o un anticuerpo de isotipo conjugado con APC de ratón, y luego analizado en un citómetro de flujo BD LSRII (BD Biosciences).

Tratamiento in vivo de ratones portadores de MM e imágenes de bioluminiscencia

Las células de mieloma MM.1S e IM9 se transdujeron retroviralmente con el virus Pinco-pGL3-luc/GFP que expresa luciferasa de luciérnaga, y las células positivas para GFP se clasificaron usando el procedimiento mencionado anteriormente, produciendo células MM.1S-GL3 e IM9-GL3, respectivamente. A los ratones NSG machos se les inyectó por vía intravenosa 8×10^6 células MM.1S-GL3 o 5×10^5 células IM9-GL3 en 400 μ l de PBS a través de la vena de la cola el día 0 para establecer un modelo de xenoinjerto ortotópico MM. En los días 7 y 14 (MM.1S) o 21 (IM-9), a los ratones se les administró por vía intravenosa 10×10^6 células efectoras, células T transducidas con CS1-CAR o células de control transducidas y simuladas, en 400 ml de PBS a través de la vena de la cola. Cinco semanas después de la inoculación con células MM, a los ratones se les infundió intraperitonealmente D-luciferina (150 mg/kg de peso corporal; Gold Biotechnology), se anestesiaron con isoflurano y se tomaron imágenes usando el sistema de imagen in vivo (IVIS) con el software Living Image (PerkinElmer).

Análisis estadístico

La prueba t de Student no pareada se usó para comparar dos grupos independientes para puntos finales continuos si se distribuye normalmente. Se utilizó ANOVA unidireccional cuando se compararon tres o más grupos independientes. Para los datos de supervivencia, se trazaron las curvas de Kaplan-Meier y se compararon mediante una prueba del rango logarítmico. Todas las pruebas eran bilaterales. Los valores de P se ajustaron para comparaciones múltiples usando el método Bonferroni. Un valor de P de menos de 0,05 se considera estadísticamente significativo.

Resultados**Generación de células T primarias que expresan CAR específico de CS1**

Se construyó un vector retroviral Pinco que codifica un CAR específico de CS1 (Pinco-CS1-CAR), que consistía en scFv anti-CS1, las regiones de bisagra y transmembrana de la molécula CD8, el resto de señalización coestimuladora CD28 y el componente citoplasmático de la molécula CD3 ζ (Fig. 1A). Las células T primarias activadas por anticuerpos anti-CD3/CD28 de un donante sano se transdujeron con partículas retrovirales que codifican CS1-CAR o vector vacío (simulación) y se clasificaron para la expresión de GFP, que fue codificada por la construcción retroviral. Para determinar si CS1-CAR se transfirió con éxito, las células clasificadas se lisaron y se sometieron a inmunoelectrotransferencia con un mAb anti-CD3 ζ . Como se muestra en la Fig. 1B, en contraste con las células T transducidas y simuladas, que solo expresaron la proteína CD3 ζ endógena, las células T transducidas con CS1-CAR expresaron la proteína de fusión quimérica CS1-scFv-CD28-CD3 ζ en el tamaño predicho además de CD3 ζ nativo. La expresión de CS1-CAR en la superficie celular se demostró mediante la tinción de células T transducidas con un anticuerpo Fab anti-ratón de cabra que reconoció la porción scFv de anti-CS1, que detectó la expresión del scFV en 70,3 % de las células T transducidas con CS1-CAR, mientras que la expresión permaneció casi indetectable en células T transducidas y simuladas (Fig. 1C).

Reconocimiento de estirpes celulares de mieloma CS1* por células T que expresan CAR específicas de CS1

La expresión superficial de CS1 se evaluó en cuatro estirpes celulares de mieloma de uso común NCI-H929, IM9, MM.1S y RPMI-8226 por citometría de flujo, lo que reveló que la proteína CS1 se expresaba de manera variable en estas estirpes celulares con una expresión mucho más alta en células NCI-H929, IM9 y MM.1S que las células RPMI-8226 con mínima expresión de CS1 (Fig. 2A). Como control negativo, la estirpe celular de riñón humano transformada, 293T, no expresaba CS1 en su superficie (Fig. 7A). Para determinar la capacidad de las células T CS1-CAR para el reconocimiento de las células de mieloma que expresaban endógenamente la secreción de CS1, IFN- γ e IL-2 mediante ELISA en sobrenadantes de células T transducidas y simuladas o células T transducidas con CS1-CAR en presencia o ausencia de cada estirpe celular de mieloma. Las células T transducidas y simuladas y las células T transducidas con CS1-CAR produjeron cada una por sí solas niveles insignificantes de IFN- γ e IL-2 (Fig. 2B y C); sin embargo, después de la exposición a las células NCI-H929 e IM9 que expresan altos niveles de CS1, las células CS1-CAR T secretaron cantidades significativamente mayores de proteínas IFN- γ e IL-2, pero no las células T simuladas. En respuesta a las células MM.1S con altos niveles de expresión de CS1, las células T transducidas con CS1-CAR también produjeron una mayor cantidad de IFN- γ que las células T transducidas y simuladas (Fig. 2B) mientras que, por razones desconocidas, esta estirpe celular no pudo activar las células T transducidas con CS1-CAR para secretar niveles más altos de IL-2 que las células T transducidas y

simuladas (Fig. 2C). Además, en comparación con los subconjuntos de células T transducidas y simuladas correspondientes, ambas células T CS1-CAR CD4⁺ (CD8⁻) y CD8⁺ mostraron una mayor secreción de IFN- γ en respuesta a las células NCI-H929 o MM.1S (Fig. 8A). Para las células RPMI-8226 con niveles muy bajos de expresión de CS1, tanto las células T transducidas y simuladas como las células T transducidas con CS1-CAR produjeron niveles bajos de IFN- γ e IL-2 que eran comparables con el fondo (Fig. 2B y C). Estos hallazgos sugieren que, en comparación con las células T transducidas y simuladas, las células T transducidas con CS1-CAR pueden reconocer más específicamente las células MM con altos niveles de expresión endógena de CS1, y volverse más activas después del reconocimiento de estas células MM.

10 **Potencia citolítica in vitro contra células de mieloma activadas por CAR específico de CS1**

Para determinar si el reconocimiento mejorado de células de mieloma CS1⁺ por células T CS1-CAR podrían conducir a una lisis de células tumorales más eficiente, se realizó un ensayo estándar de liberación de cromo-51 de 4 horas. Las células NCI-H929, IM9 y MM.1S, que expresan altos niveles de CS1, fueron resistentes a la muerte mediada por células T transducidas y simuladas, incluso a relaciones E/T tan altas como 20:1; sin embargo, estas células se lisaron de manera eficiente mediante células T CS1-CAR en todas las relaciones E:T probadas (Fig. 3A, tercera a la izquierda). Sin embargo, en comparación con las células T transducidas y simuladas, la actividad citolítica de las células RPMI-8226 que expresan niveles bajos de CS1 solo podría aumentarse ligeramente con la co-incubación con las células T transducidas con CS1-CAR (Fig. 3A, primera a la derecha). La desgranulación y activación de las células T se caracterizó además por evaluar la expresión de CD107a y CD69 en células T transducidas y simuladas y células T transducidas con CS1-CAR después de la incubación con o sin células de mieloma NCI-H929 que, como se mencionó anteriormente, desencadenó una fuerte respuesta en células T CS1-CAR con respecto a la liberación de citocinas y la actividad citolítica. De acuerdo con los datos antes mencionados sobre la liberación de citocinas y la actividad citolítica, la desgranulación y activación se produjo en mayor medida en las células T CS1-CAR que en las células T simuladas en respuesta a las células NCI-H929, como lo demuestra la regulación positiva de la coexpresión de la superficie de CD107a movilizado y el marcador de activación, CD69 (Fig. 3B).

Además, en comparación con los correspondientes subconjuntos de células T transducidas y simuladas, ambas células T CS1-CAR CD4⁺(CD8⁻) y CD8⁺ exhibieron mayores niveles de desgranulación cuando fueron estimuladas por las células NCI-H929 o MM.1S (Fig. 8B). Además, usando una estrategia de tinción intracelular, en comparación con las células T transducidas y simuladas, las células T transducidas con CS1-CAR expresaron niveles significativamente más altos de granzima B, pero no de perforina, incluso en ausencia de células diana (Fig. 3C y D), lo que sugiere que la granzima B puede estar involucrada predominantemente en la mediación de la actividad citolítica de las células T redirigidas por CS1. Este hallazgo está en línea con un informe anterior que muestra que las células T injertadas con un CAR específico de antígeno carcinoembrionario que incorpora un resto de señalización combinado CD28-CD3 ζ albergaban niveles elevados de granzima B en comparación con las células T no modificadas (Koehler H, y col. Cancer Res 2007 67:2265-73).

40 **La sobreexpresión forzada de CS1 en células diana mejora el reconocimiento y la destrucción por las células T que expresan CAR específicas de CS1**

La respuesta considerablemente más fuerte en las células T CS1-CAR en términos de liberación de citocinas y citotoxicidad cuando es estimulada por células de mieloma que expresan altos niveles de CS1 provocó la investigación de si la expresión ectópica de CS1 en células de mieloma con niveles endógenamente bajos de expresión de CS1 podría provocar un aumento en liberación de citocinas y citólisis. Con este fin, las células de mieloma RPMI-8226 con bajos niveles de expresión endógena de CS1 se transdujeron con lentivirus que codifican el vector vacío CS1 o PCDH humano como un control transducido y simulado. La eficacia de la transducción se controló mediante la detección de la proteína GFP codificada por los lentivirus, y el porcentaje de células positivas para GFP fue superior al 90 % mediante análisis de citometría de flujo. La sobreexpresión de CS1 se confirmó tiñendo la superficie de las células transducidas con un anticuerpo anti-CS1 conjugado con PE (Fig. 4A). El ensayo de liberación de cromo-51 indicó que la expresión forzada de CS1 dio como resultado un aumento perceptible en la susceptibilidad de las células RPMI-8226 a la lisis por las células T transducidas con CS1-CAR en oposición a las células T transducidas y simuladas (Fig. 4B). Luego, la producción de IFN- γ e IL-2 se evaluó mediante ELISA, lo que demuestra que, en comparación con las células T transducidas y simuladas, las células T transducidas con CS1-CAR produjeron cantidades significativamente mayores de IFN- γ e IL-2 en respuesta a células RPMI-8226 que sobreexpresan CS1; mientras tanto, solo hubo un aumento moderado en la secreción de IFN- γ y ningún cambio en la secreción de IL-2 cuando las células T CS1-CAR se co-cultivaron con células RPMI-8226 vacías modificadas por vector (Fig. 4C y D). Asimismo, la sobreexpresión de CS1 en CS1-293T, una estirpe celular transformada, también desencadenó la liberación mejorada de citocinas y la citólisis por las células T CS1-CAR (Fig. 7B-7D). Esto fue consistente con otros informes sobre células T CAR que se dirigen a otros antígenos tumorales (Sanchez C, y col. Prostate Cancer Prostatic Dis 2013 16:123-31; Chinnasamy D, y col. J Clin Invest 2010 120:3953-68). Estos hallazgos corroboraron que el aumento del reconocimiento y la destrucción de las células diana por las células T CS1-CAR se produjeron de manera dependiente de CS1.

Reconocimiento y destrucción mejorados de las células de mieloma primario por las células T que expresan CAR específico de CS1 autólogas

Para estudiar los efectos de las células T que expresan CAR específico de CS1 en un contexto clínicamente más relevante, se investigó si las células T autólogas transducidas con CS1-CAR podían reconocer y destruir eficazmente las células tumorales recién aisladas de pacientes con mieloma. Al igual que las células T de donantes sanos, las células T de pacientes con mieloma recidivante se expandieron y manipularon con éxito para expresar CS1-CAR por infección retroviral, como se manifiesta por el 60,7 % de las células T que se tiñen positivamente con anticuerpos Fab anti-ratón y anticuerpos anti-CD3 humanos determinado por citometría de flujo (Fig. 5A). Se aislaron células de mieloma primario CD138⁺ de pacientes usando selección magnética positiva, y se observó que las células de mieloma primario eran uniformemente positivas para la expresión de superficie de CS1 usando citometría de flujo (Fig. 5B). Mediante el ensayo de liberación de cromo 51, se observó que las células de mieloma de los pacientes eran altamente resistentes a la lisis por las células T autólogas transducidas y simuladas, pero se volvieron susceptibles a las células T autólogas transducidas con CS1-CAR incluso a una relación (E/T) baja (2.5:1) (Fig. 5C). De acuerdo con estos resultados de citotoxicidad, las células T autólogas CS1-CAR produjeron cantidades significativamente mayores de IFN- γ en respuesta a las células de mieloma en comparación con las células T autólogas transducidas y simuladas (Fig. 5D). Estos hallazgos demuestran que las células T equipadas con CS1-CAR pueden reconocer y erradicar eficazmente las células de mieloma en el entorno autólogo. *ex vivo*.

Las células T dirigidas por CS1 suprimen el crecimiento tumoral *in vivo* y prolongan la supervivencia de los ratones con tumor en modelos de xenoinjerto ortotópico de mieloma

El potencial terapéutico de las células T CS1-CAR se evaluó en un modelo de ratón NSG injertado con MM.1S. La inyección intravenosa de células MM.1S se ha usado ampliamente para establecer un modelo murino de xenoinjerto de MM, ya que esto puede conducir al injerto en la médula ósea y en el hueso, así como al establecimiento constante de lesiones óseas multifocales, que recapitula estrechamente la MM humana (Mitsiades CS, y col. Cancer Cell 2004 5:221-30; Runnels JM, y col. J Biomed Opt 2011 16:011006). Para facilitar el monitoreo del crecimiento tumoral, las células MM.1S se genomanipularon para expresar tanto la GFP como la luciferasa de luciérnaga mediante infección retroviral, y las células GFP⁺ se clasificaron y se injertaron por vía intravenosa en ratones NSG para iniciar el crecimiento tumoral. Estos ratones fueron luego infundidos por vía intravenosa con células T transducidas y simuladas, células T transducidas con CS1-CAR o PBS. De acuerdo con los informes anteriores (Mitsiades CS, y col. Cancer Cell 2004 5:221-30; Runnels JM, y col. J Biomed Opt 2011 16:011006), las imágenes de bioluminiscencia usando IVIS mostraron que los ratones NSG con MM.1S en el grupo tratado con PBS desarrollaron lesiones tumorales diseminadas en cráneos, vértebras, pelvis y fémures (Fig. 6A), y la mayoría de los ratones mostraron parálisis en las patas traseras 5 semanas después de la inoculación de células tumorales. La infusión de células T CS1-CAR redujo notablemente la carga tumoral según lo determinado por las imágenes de bioluminiscencia, así como prolongó la supervivencia general de los ratones NSG con MM.1S, mientras que la infusión de células T infectadas y simuladas no resultó en una erradicación eficiente del tumor y mejoró la supervivencia de ratones (Fig. 6A y B).

Para validar aún más la capacidad anti-MM *in vivo* de células T CS1-CAR, se evaluó el impacto de las células T CS1-CAR utilizando un modelo de ratón NSG injertado con IM9. Se observaron datos similares a los mostrados con MM.1S. Las imágenes de bioluminiscencia indicaron que la infusión de células T transducidas con CS1-CAR podría erradicar eficazmente los tumores establecidos en ratones con IM9, mientras que la infusión de células T transducidas y simuladas no pudo reducir la carga tumoral (Fig. 9A). Cuarenta y cuatro días después del tratamiento inicial, se observó una tasa de supervivencia del 100 % para los ratones con IM9 que recibieron infusión de células T CS1-CAR, mientras que la tasa de supervivencia fue solo del 28,6 % y 16,7 % para ratones de control que reciben células T simuladas y PBS, respectivamente (Fig. 9B).

Ejemplo 2: Las células asesinas naturales genomanipuladas por el receptor de antígeno quimérico (CAR) específico de CS1 mejoran la actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo* contra el mieloma múltiple humano

En este estudio, las células NK humanas fueron genomanipuladas para expresar un CAR que era específico de CS1 e incorporaron un dominio de señalización coestimuladora CD28-CD3 ζ . Se evaluó la función anti-MM de estas células *in vitro* y en un modelo murino de xenoinjerto ortotópico de MM *in vivo*. Los resultados mostraron que la expresión de CS1-CAR podría redirigir las células NK para erradicar específicamente y eficientemente las células MM que expresan CS1, ambas *in vitro* e *in vivo*, y esta erradicación dependía de CS1. Los datos sugieren que esta estrategia CAR es adecuada para el desarrollo de una inmunoterapia efectiva basada en células NK como un medio para tratar pacientes con MM refractaria o recidivante. Además, en contraste con las células T CAR, las células CAR NK permiten el uso de fuentes de células NK alogénicas, que tienen menos probabilidades de causar e incluso pueden ayudar a suprimir la enfermedad de injerto contra huésped (Olson JA, y col. Blood 2010 115:4293-4301), al tiempo que potencia un aumento en la citotoxicidad debido a los receptores tipo inmunoglobulina de células citolíticas (KIR) no coincidentes (Ruggeri L, y col. Science 2002 295:2097-2100).

Materiales y procedimientos***Cultivo celular***

- 5 Las estirpes celulares de mieloma múltiple humano L363 (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares, Braunschweig, Alemania), IM9 [Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Manassas, VA, EE. UU.] y U266 (ATCC) se mantuvieron en medio RPMI 1640 con suero bovino fetal al 10 % (FBS) (Life Technologies, Grand Island, NY, EE. UU.). Las estirpes celulares NK dependientes de IL-2 humanas NK-92 (ATCC) y NKL se mantuvieron en medio RPMI 10 1640 suplementado con FBS al 20 % y 150 UI/ml de rIL-2 (Hoffman-LaRoche Inc., Nutley, NJ, EE. UU.). 293T (ATCC), y la estirpe celular de empaquetamiento de Phoenix se mantuvo en medio DMEM con FBS al 10 %. Las células de MM primario CD138⁺ se aislaron del aspirado de médula ósea de pacientes con MM usando el kit de selección CD138 positiva para sangre entera y médula ósea humana EASYSEP (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canadá) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Todo el trabajo humano fue aprobado por la Junta de Revisión Institucional de la Universidad 15 Estatal de Ohio.

Ratones

- Se obtuvieron ratones NOD.Cg-prkdcscid IL2rgtm1Wjl/szJ (NSG) de seis a ocho semanas de edad de Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, EE. UU.). Todo el trabajo con animales fue aprobado por el Comité de Cuidado y Uso de 20 Animales de la Universidad Estatal de Ohio. Los ratones fueron monitoreados con frecuencia para detectar la progresión de la enfermedad de MM y fueron sacrificados cuando estaban moribundos con los síntomas de parálisis de las extremidades posteriores, letargo y pérdida de peso obvia.

25 Generación de construcción lentiviral anti-CS1 CAR

- El fragmento CS1-scFv, amplificado a partir de la estirpe celular de hibridoma Luc90, se fusionó con una secuencia que codifica una etiqueta Myc inmediatamente después de la secuencia que codifica CS1-VL. Las secuencias de ADN fusionadas se incorporaron con CD28-CD3ζ que se realizó una incisión a partir de un vector retroviral. Todo el fragmento 30 CS1-scFv-etiqueta myc-CD28-CD3ζ se ligó en un vector lentiviral designado como PCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP (PCDH, System Biosciences, Mountain View, CA, EE. UU.) para generar una construcción PCDH-CS1-scFv-etiqueta de myc-CD28-CD3ζ (PCDH-CS1-CAR).

Producción de lentivirus y transducción de células NK

- 35 Para producir el sobrenadante lentiviral pseudotipado VSVG, las células 293T cultivadas en medio DMEM (Invitrogen) se co-transfectaron con PCDH-CS1-scFv-CD28-CD3cζ o el vector de control PCDH (para generar virus para la infección simulada con el vector vacío) junto con las construcciones de empaquetamiento, pCMV-VSVG y pCMV-dr9, usando reactivo de transfección de fosfato de calcio (Promega, Madison, WI, EE. UU.). Después de 24 h, los medios DMEM se 40 reemplazaron con medios RPMI-1640 que contenían FBS al 20 %. 48 h después de la transfección, se recogió el medio acondicionado que contenía lentivirus y se filtró a través de una unidad de filtro de 0,45 μm (Millipore, Billerica, MA, EE. UU.) para eliminar los restos celulares. La infección viral se realizó en placas de 6 pocillos utilizando 2×10^6 células NK-92 o NKL en un volumen total de 2 ml de sobrenadante lentiviral que contiene 8 μg/ml de polibreno (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) y 450 UI/ml de rIL-2. Las células se centrifugaron a 1.800 rpm a 32 °C durante 45 min, luego las 45 placas se colocaron en una incubadora a 37 °C durante 2 h. La infección se repitió una segunda vez el mismo día y una vez más al día siguiente. Después de la tercera transducción, las células se mantuvieron en medio RPMI 1640 suplementado con FBS al 20 % y 150 UI/ml de rIL-2 a 37 °C. Las células NK transducidas se enriquecieron mediante dos rondas de clasificación celular utilizando un clasificador de células FACS Aria II (BD Biosciences, San Jose, CA, EE. UU.). Las células positivas se seleccionaron en base a la expresión del marcador de superficie de la proteína de 50 fluorescencia verde (GFP), que se codificó en el vector PCDH.

Generación de una estirpe celular U266 que expresa establemente CS1

- Las secuencias codificantes de CS1 humano se amplificaron a partir de ADNc aislado de células IM9 mediante PCR, 55 luego se subclonaron en un vector lentiviral PCDH para generar una construcción PCDH-CS1. La producción de lentivirus y la infección de células U266 se realizaron utilizando los procedimientos descritos anteriormente. Las células positivas para GFP se clasificaron luego usando un clasificador de células FACS Aria II (BD Biosciences, San Jose, CA, EE. UU.).

Análisis de inmunoelectrotransferencia

- 60 Las células se lavaron con PBS y se lisaron directamente en tampón laemmli. Los lisados se separaron electroforéticamente en un gel SDS-PAGE con gradiente de 4 % a 15 % (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.).

y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (EMD Millipore, Billerica, MA, EE. UU.). La membrana se bloqueó con leche al 5 % en solución salina tamponada con Tris (TBS) suplementada con Tween 20 al 0,1 %. El anticuerpo monoclonal de cadena CD3 ζ anti-humano de ratón (BD Pharmingen, San Diego, CA, EE. UU.) se diluyó 1:1.000 con leche al 5 % en TBS suplementado con Tween 20 al 0,1 %, y esta solución de anticuerpo se añadió para reaccionar con la membrana durante la noche. La membrana se lavó tres veces en TBS suplementado con Tween 20. El anticuerpo secundario conjugado con HRP (GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA, EE. UU.) se diluyó 1:5.000 con leche al 5 % en TBS suplementado con Tween 20 al 0,1 % y se añadió a la membrana durante 1 h. La membrana se lavó nuevamente cuatro veces en TBS suplementado con Tween 20, y se añadió un reactivo de quimioluminiscencia mejorado (ECL; GE Healthcare Biosciences) durante 1 min. La membrana se expuso en la película durante varios períodos de tiempo para generar una imagen expuesta adecuadamente.

Citometría de flujo

Para analizar la expresión superficial de CS1-CAR, se incubó una suspensión de células individuales de células NK transducidas durante 1 hora a 4 °C con un mAb 9E10 de ratón anti-etiqueta Myc (Sigma-Aldrich). Las células se lavaron dos veces con PBS y luego se incubaron durante 30 minutos a 4 °C con anticuerpo secundario IgG1 anti-ratón de rata conjugado con PE (BD Pharmingen). La expresión superficial de CS1 y CD138 en células de mieloma se examinó mediante análisis FACS usando un analizador BD LSRII después de que las células se tiñeron con mAb anti-CS1 de ratón conjugado con PE (eBiosciences, San Diego, CA, EE. UU.) y mAb anti-CD138 de ratón conjugado con APC (BD Pharmingen). El análisis de los datos se realizó con el software FLOWJO (Tree Star Inc., Ashland, OR, EE. UU.).

Ensayo de citotoxicidad

Para la detección de la lisis mediada por células NK, se marcaron células diana MM durante 1,5 h con 100 mCi de cromó-⁵¹Cr), se lavaron cuatro veces con medio RPMI regular y se ajustaron a una concentración de 5.000 células por pocillo en un volumen de 100 μ l de una placa de microtitulación con fondo en V de 96 pocillos. Se añadieron células NK transducidas y simuladas enriquecidas con FACS o CS1-CAR en un volumen de 100 μ l en pocillos por triplicado en diversas relaciones de efector a diana (E:T). Después de 4 h de incubación a 37 °C, se recogieron 100 μ l de sobrenadante de cada pocillo y se transfirieron a viales de centelleo que contenían un cóctel de centelleo líquido (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EE. UU.) para que la liberación de ⁵¹Cr pudiese medirse en un contador TOPCOUNT (Canberra Packard, Meriden, CT, EE. UU.). Para determinar la liberación máxima ⁵¹Cr, la suspensión de células diana se incubó con 100 μ l de SDS. El porcentaje de lisis específica se calculó usando la fórmula estándar: $100 \times (\text{liberación experimental cpm} - \text{liberación espontánea cpm}) / (\text{liberación máxima cpm} - \text{liberación espontánea cpm})$.

Ensayo de liberación de interferón- γ

Las células diana de mieloma se co-cultivaron con células efectoras NK en placas de fondo en V de 96 pocillos durante 24 h. En total, $2,5 \times 10^5$ células de estirpe celular de mieloma o $1,0 \times 10^5$ células de mieloma primario se incubaron con $2,5 \times 10^5$ o $5,0 \times 10^5$ células NK, respectivamente. Los sobrenadantes libres de células se analizaron para determinar la secreción de interferón- γ (IFN- γ) mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) utilizando un kit de R&D Systems (Minneapolis, MN, EE. UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los datos representados en las Figuras representan valores medios de pocillos por triplicado de uno de los tres experimentos representativos con resultados similares.

Un modelo murino ortotópico de MM y tratamiento in vivo de ratones con MM e imágenes de bioluminiscencia

Las células IM9 se transdujeron retroviralmente con el virus Pinco-pGL3-luc/GFP que expresa luciferasa de luciérnaga como se describió previamente (He S y col. Blood 2013 121:4663-4671). Las células positivas para GFP se clasificaron usando un clasificador de células FACS Aria II (BD Biosciences), y se designaron como células "IM9-Luc". Luego, a los ratones NSG machos de seis a ocho semanas de edad se les inyectó por vía intravenosa (i.v.) $0,5 \times 10^6$ células de MM IM9-Luc en 400 μ l de solución salina tamponada con fosfato a través de la vena de la cola el día 0 para establecer un modelo de xenoinjerto ortotópico de MM. A partir del día 7, a los ratones se les inyectó i.v. 5×10^6 células efectoras, es decir, células CS1-CAR NK-92 o células de control transducidas y simuladas, en 400 μ l de solución salina tamponada con fosfato una vez cada 5 días (cinco veces en total). Cuatro semanas después de la inoculación con IM9-Luc, a los ratones se les infundió intraperitonealmente (i.p.) D-luciferina (150 mg/kg de peso corporal; Gold Biotechnology, St. Louis, MO, EE. UU.), se anestesiaron con isoflurano y se tomaron imágenes usando un sistema de imágenes in vivo (IVIS-100, Perkin-Elmer, Waltham, MA, EE. UU.) con el software Living Image (Perkin-Elmer).

Análisis inmunohistoquímico

Las vértebras espinales se fijaron en fosfato de formalina tamponado al 10 % y se descalcificaron en EDTA saturado, y luego se incrustaron en parafina. Se tiñeron secciones de cinco micrómetros de espesor con hematoxilina y eosina (H y

E) para examen histológico. Las secciones se inmunotifieron para la identificación de células MM humanas con mAb CD138 anti-humano de ratón (dilución 1:50; Thermo-Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) siguiendo procedimientos de tinción inmunohistoquímica estándar. Se usó IgG anti-ratón conjugada con peroxidasa de rábano picante como anticuerpo secundario, seguido de una reacción enzimática peroxidasa.

5

Estadísticas

La prueba t de Student no pareada se usó para comparar dos grupos independientes para puntos finales continuos si se distribuye normalmente. Se utilizó ANOVA unidireccional cuando se compararon tres o más grupos independientes. Para puntos finales no distribuidos normalmente, como intensidad de bioluminiscencia *in vivo*, se usó una prueba de Kruskal-Wallis para comparar la mediana de NK-92-CS1-CAR con NK-92-EV y grupos de solución salina tamponada con fosfato. Para los datos de supervivencia, se trazaron las curvas de Kaplan-Meier y se compararon mediante una prueba del rango logarítmico. Todas las pruebas son bilaterales. Los valores de P se ajustaron para comparaciones múltiples por el método de Bonferroni. Un valor P de <0,05 se considera estadísticamente significativo.

15

Resultados

Generación de células NK-92 y NKL NK que expresan CS1-CAR

Se generó una construcción CS1-CAR específica con un esqueleto de vector lentiviral PCDH, que contiene secuencialmente un péptido señal (SP), una región variable de cadena pesada (VH), un enlazador, una región variable de cadena ligera (VL), una etiqueta Myc, un bisagra, CD28 y CD3ζ (Figura 13A). Las estirpes celulares NK-92 y NKL NK se transdujeron con la construcción CAR y luego se clasificaron para la expresión de GFP, un marcador expresado por el vector. La inmunoelectrotransferencia de las células clasificadas demostró que CS1-CAR se introdujo y expresó con éxito, como lo demuestra la expresión del receptor quimérico CS1-scFv que contiene CD3ζ en las estirpes celulares NK-92 y NKL transducidas con la construcción CAR en lugar de con el control vector (Figura 13B). Además, un análisis de citometría de flujo después de la tinción de la superficie Ab anti-Myc indicó que CS1-CAR se expresó en la superficie de las células NK-92 y NKL transducidas con la construcción CS1-CAR (Figura 13C).

Las células NK modificadas con CS1-CAR erradican más eficazmente células de MM CS1⁺, pero no células CS1⁻ *in vitro* en comparación con células NK transducidas y simuladas

Después de generar las células NK CS1-CAR, se determinó si destruyen selectivamente células de MM CS1⁺ mejor que CS1⁻. Para este propósito, se confirmó primero que las estirpes celulares de MM IM9 y L363 expresaban constitutivamente la proteína CS1 en su superficie, mientras que la expresión de CS1 era insignificante en las células de MM U266 (Figura 14A). A continuación, un ensayo de liberación de cromo 51 de 4 h indicó que, en comparación con las células NK-92 transducidas y simuladas, las células NK-92 transducidas con CS1-CAR mejoraron significativamente su capacidad para destruir células CS1⁺ IM9 y L363 (Figuras 14B y 14C, paneles izquierdos). Se observaron datos similares en experimentos repetidos usando células NKL transducidas con CS1-CAR (Figuras 14B y 14C, paneles de la derecha). Sin embargo, tanto las células NK-92 o NKL que expresan CS1-CAR y transducidas y simuladas fueron similares en sus bajos niveles de citotoxicidad contra las células de mieloma CS1U266 (Figura 14D). Además, la expresión forzada de CS1-CAR no indujo una apoptosis obvia en las células NK-92 o NKL según lo determinado por análisis de tinción de 7AAD/anexina V usando citometría de flujo (Figura 20), lo que sugiere que la expresión de CS1-CAR no causó citotoxicidad a las propias células NK-92 o NKL. De manera similar, la expresión de CS1-CAR en células NK humanas primarias purificadas aumentó su citotoxicidad contra células de mieloma CS1⁺ IM9.

Las células NK modificadas con CS1-CAR secretan más IFN-γ que las células NK transducidas y simuladas después de la exposición a células de MM CS1⁺

El dominio de señalización de la molécula coestimuladora de CD28, que se incluyó en la construcción CAR, puede mejorar la activación después del reconocimiento del scFv CS1 con el antígeno CS1 en la superficie de las células MM. Por lo tanto, la inclusión de este dominio de señalización puede tener la capacidad de activar las células NK no solo para tener una citotoxicidad más alta, sino también para producir más IFN-γ, este último también es importante para la vigilancia del tumor y la activación de células T CD8⁺ y macrófagos (Martin-Fontecha A, y col. Nat Immunol 2004 5:1260-1265; Tu SP, y col. Cancer Res 2011 71:4247-4259; Ma J, y col. Cell Mol Life Sci 2003 60:2334-2346). Para probar esto, las células efectoras NK modificadas por CS1-CAR o genomanipuladas por control se cultivaron solas o co-cultivaron con células de mieloma CS1⁺, incluidas las estirpes celulares de MM IM9 y L363. Después de 24 h, la producción de IFN-γ se midió por ELISA. Como se muestra en la Figura 15, las células NK-92 o NKL modificadas con CS1-CAR y transducidas y simuladas produjeron espontáneamente niveles bajos o insignificantes de IFN-γ cuando se incubaron solas. El co-cultivo células tumorales de MM CS1⁻ (IM9 o L363) indujeron IFN-γ tanto en CS1-CAR como en las estirpes celulares NK-92 o NKL transducidas y simuladas; sin embargo, las células NK-92 o NKL modificadas con CAR produjeron niveles significativamente más altos de IFN-γ que las células NK-92 transducidas y simuladas (Figuras 15A y 15B, paneles

izquierdos) o NKL (Figuras 15A y 15B, paneles derechos). Cuando se co-cultiva con la estirpe celular de MM CS1⁺, U266, tanto las células NK-92 transducidas y simuladas como las transducidas con CS1-CAR pero no las células NKL transducidas produjeron niveles más altos de IFN- γ que las células correspondientes que no habían sido co-cultivadas con células U266 (Figura 15C). Esto sugiere que una interacción única entre los receptores de células NK en las células NK-92 y sus ligandos en las células U266 puede inducir la producción de IFN- γ independiente de CS1 por las células NK-92. Además, las células NK-92 y NKL transducidas con CS1-CAR no pudieron producir más IFN- γ que las células NK-92 y NKL transducidas y simuladas correspondientes cuando se co-cultivaron con células U266 (Figura 15C). Estos resultados están de acuerdo con los datos de citotoxicidad mencionados anteriormente, y juntos indican que la modificación con CS1-CAR puede mejorar drásticamente las funciones efectoras de las células NK, tanto en términos de citotoxicidad como de producción de IFN- γ , en respuesta a células de mieloma CS1⁺ pero no a CS1⁻.

La expresión forzada de CS1 en células U266 mejora la citotoxicidad y la producción de IFN- γ de las células NK-92-CS1-CAR

A continuación se exploró si esta actividad mejorada de las células NK CS1-CAR se basa en la expresión del antígeno CS1 en las células MM. La observación mencionada anteriormente: que la introducción de CS1-CAR confirió a las células NK-92 un aumento de la actividad citotóxica y una mayor producción de IFN- γ en respuesta a células de mieloma CS1⁺, pero no a CS1⁻ - la investigación inducida por las células de mieloma U266 indica si la sobreexpresión de CS1 en las células U266 es suficiente para cambiar la sensibilidad de las células U266 a las células NK-92-CS1-CAR. Para este propósito, CS1 se expresó ectópicamente en células U266 por infección lentiviral. El análisis de citometría de flujo confirmó que la proteína CS1 se expresó con éxito en la superficie de las células U266-CS1 (Figura 16A). El ensayo de liberación de cromo 51 indicó que, en comparación con las células NK-92 transducidas y simuladas, hubo un aumento significativo en la actividad citotóxica de las células NK-92 transducidas con CS1-CAR hacia las células U266 que sobreexpresan CS1 (Figura 16B). Del mismo modo, en comparación con los co-cultivos paralelos que contienen células NK-92 transducidas y simuladas, las células NK-92-CS1-CAR co-cultivadas con células U266 que sobreexpresan CS1 secretan niveles significativamente más altos de IFN- γ (Figura 16C). Sin embargo, de acuerdo con los datos de las Figuras 14D y 15C, no hubo diferencia en la citotoxicidad y la secreción de IFN- γ entre las células NK-92-CS1-CAR y las células NK-92 transducidas y simuladas cuando se incubaron con células U266 transducidas con un control vectorial vacío (Figuras 16B y 16C). Estos resultados sugirieron que el mayor reconocimiento y destrucción de las células de mieloma por las células NK-92-CS1-CAR se produce de manera dependiente de CS1.

Caracterización fenotípica de las células NK-92-CS1-CAR

A continuación se investigó si la expresión de un CAR específico de CS1 podría cambiar el fenotipo de la célula NK. La citometría de flujo se usó para comparar la expresión de antígenos en la superficie de las células NK-92 transducidas con CS1-CAR y transducidas y simuladas, tras el cultivo en presencia o ausencia de células de mieloma IM9. Como se muestra en la Figura 17A, no hubo diferencia entre las células NK-92 CS1-CAR y las transducidas y simuladas, ya sea cultivadas en presencia o ausencia de células IM9, en la expresión de receptores de células NK que incluyen NKp30, NKp46, NKG2C y NKG2D. La expresión de los marcadores de activación de células NK, CD6928 y HLA-DR (Phillips JH, y col. J Exp Med 1984 159:993-1008; Spits H, y col. Immunity 2007 26:11-16) también fue evaluada. El reconocimiento de las células IM9 no provocó la expresión de CD69 en las células NK-92 transducidas y simuladas, pero indujo un aumento moderado, pero significativo, en la expresión de CD69 en la superficie de las células NK-92 transducidas con CS1-CAR (Figura 17A). Curiosamente, la co-incubación con células IM9 causó un aumento dramático en la expresión de HLA-DR en células NK-92 transducidas con CS1-CAR y transducidas y simuladas. En ausencia de células diana IM9, no hubo diferencia obvia en la expresión de HLA-DR entre las células NK-92 transducidas con CS1-CAR y transducidas y simuladas; sin embargo, tras la estimulación con células IM9, la expresión de HLA-DR se volvió significativamente mayor en las células NK-92-CS1-CAR que en las células NK-92 transducidas y simuladas. Por lo tanto, el aumento en los marcadores de activación, especialmente HLA-DR, expresados en las células NK-92-CS1-CAR puede haber ocurrido en relación con la citotoxicidad mejorada y la producción de IFN- γ por estas células cuando están expuestas a células de MM CS1⁺. Mediante el uso de tinción intracelular, en comparación con las células NK transducidas y simuladas, las células NK-92-CS1-CAR tenían niveles significativamente más altos de expresión de perforina y granzima B, incluso en ausencia de células tumorales de MM (Figuras 17B y 17C). Esto es consistente con un informe anterior sobre la expresión elevada de granzima B en las células T CAR (Koehler H, y col. Cancer Res 2007 67:2265-2273), y también es coherente con el hecho de que la expresión de perforina y granzima B generalmente se correlaciona con la actividad citotóxica de las células NK (Krzewski K, y col. Front Immunol 2012 3:335).

Las células NK-92 transducidas con CS1-CAR reconocen y eliminan más eficazmente las células de MM primario resistentes a NK ex vivo

Para hacer que los hallazgos sean clínicamente más relevantes, se investigó si las células NK-92 modificadas con CS1-CAR también albergaban una actividad citolítica mejorada y la producción de IFN- γ al reconocer las células de MM primario ex vivo. La citometría de flujo se utilizó para evaluar la expresión superficial de CS1 en células de MM primario

CD138⁺ seleccionadas con microesferas magnéticas de pacientes con MM (Figura 18A). De acuerdo con el informe anterior, que muestra que la proteína CS1 se expresó altamente en células de paciente con MM purificadas con microesferas magnéticas CD138 (Hsi ED, y col. Clin Cancer Res 2008 14:2775-2784; Tai YT, y col. Blood 2008 112:1329-1337), la proteína CS1 se expresó de manera uniforme en la superficie de las células de MM primario (Figura 18A).

5 Mediante el ensayo de liberación de cromo-51, se demostró que las células de mieloma primario recién aisladas de pacientes con MM eran altamente resistentes a la lisis mediada por células NK-92 incluso a relaciones E:T tan altas como 40:1 y 20:1; sin embargo, esta resistencia podría ser parcialmente superada por la expresión celular NK-92 de CS1-CAR, lo que resultó en un aumento dramático en la erradicación de las células de mieloma primario (Figura 18B). En línea con el resultado de citotoxicidad, después de 24 h de co-cultivo con células de mieloma primario, las células NK-92

10 transducidas con CS1-CAR también secretaron niveles significativamente más altos de IFN- γ que las células NK-92 transducidas y simuladas (Figura 18C).

Las células NK-92 transducidas con CS1-CAR inhiben el crecimiento tumoral de MM y prolongan la supervivencia de los ratones portadores de tumor en un modelo de xenoinjerto ortotópico de MM

15 Para abordar adicionalmente la posible aplicación terapéutica de las células NK-92-CS1-CAR, se examinó su actividad antitumoral en ratones NSG xenoinjertados con IM9. Se generó una estirpe celular IM9 que expresa luciferasa de luciérnaga (IM9-Luc) mediante la transducción retroviral de células IM9 con virus que expresa luciferasa de luciérnaga, y luego se realiza una clasificación de células basada en GFP. La expresión de ARNm de luciferasa de luciérnaga de

20 longitud completa se confirmó por RT-PCR. Al igual que las células de mieloma típicas, las células IM9-Luc expresaron la proteína CD138 en su superficie. De acuerdo con un informe anterior (Francisco JA y col. Cancer Res 2000 60:3225-3231), los ratones NSG con IM9-Luc mostraron enfermedad diseminada, manifestada por parálisis de las extremidades posteriores y ataxia motora. El examen histológico de las vértebras espinales en un ratón con parálisis de las extremidades posteriores mostró la presencia de numerosas células tumorales y lesiones osteolíticas en el tejido óseo (Figura 19A,

25 izquierda). La tinción inmunohistoquímica con anticuerpo anti-CD138 específico para humanos confirmó aún más la presencia de células tumorales (Figura 19A, derecha). La imagen de bioluminiscencia se utilizó para controlar el crecimiento del tumor IM9-Luc. Como se muestra en las Figuras 19B y 19C, y de acuerdo con los datos de citotoxicidad *in vitro*, comparando los ratones que más tarde recibieron inyecciones con células de control transducidas y simuladas, los tumores IM9-Luc fueron suprimidos significativamente en ratones a los que luego se les administraron células NK-92-

30 CS1-CAR. Además, el tratamiento con células NK-92-CS1-CAR prolongó significativamente la supervivencia de los ratones con tumores IM9-Luc en comparación con el tratamiento con las células de control NK-92 transducidas y simuladas (Figura 19D). Cabe destacar que cuando las células NK-92-CS1-CAR o las células NK-92 transducidas y simuladas se administraron de manera similar, pero sin la inyección i.v. de células IM9-Luc, los ratones no desarrollaron la enfermedad diseminada ni murieron.

35

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Yu, Jianhua
Hofmeister, Craig
5 Chu, Jianhong

<120> CÉLULAS EFECTORAS INMUNITARIAS GENOMANIPULADAS CON UN RECEPTOR DE ANTÍGENO QUÍMICO ESPECÍFICO DE CS1

10 <130> 10336-088WO1

<150> US 61/819.141
<151> 03-05-2013

15 <150> US 61/876.492
<151> 11-09-2013

<160> 29

20 <170> Patente en versión 3.5

<210> 1
<211> 18
<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética

30 <400> 1

Met	Gly	Trp	Ser	Ser	Ile	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Thr	Ala	Thr	Gly
1				5					10					15	

Val His

<210> 2
35 <211> 54
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Construcción sintética

<400> 2

atgggatgga gctctatcat cctctttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccac

54

45

<210> 3
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 3

55

Met	Ala	Leu	Pro	Val	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu	His	Ala	Ala	Arg	Pro
1				5					10					15					20	

<210> 4
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 4
 10 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Gly
 20
 <210> 5
 <211> 16
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética
 20 <400> 5
 Leu Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10 15
 25 <210> 6
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 6
 35 **ctcgagccca aatcttgtga caaaactcac acatgcccac cgtgcccg**
 <210> 7
 <211> 24
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética
 45 <400> 7
 Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
 20
 50 <210> 8
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

48

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 8

5 Ile Ile Ser Phe Phe Leu Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu
 1 5 10 15

Leu Phe Phe Leu Thr Leu Arg Phe Ser Val Val
 20 25

<210> 9
 <211> 27
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

15 <400> 9

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
 20 25

20 <210> 10
 <211> 81
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 10

ttttgggtgc tgggtggtggt tgggtggagtc ctggccttgct atagccttgct agtaacagtg 60

30 gcctttatta ttttctgggt g 81

<210> 11
 <211> 42
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

40 <400> 11

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
 1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
 20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
 35 40

<210> 12
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 12
 10 Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
 1 5 10 15
 Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
 20 25 30
 Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 35 40
 <210> 13
 <211> 123
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética
 20
 <400> 13
 aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc ccgccgcccc 60
 gggcccaccc gcaagcatta ccagccctat gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc 120
 tcc 123
 25 <210> 14
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 14
 35 Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly

ES 2 777 940 T3

1	5	10	15
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr	20	25	30
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys	35	40	45
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys	50	55	60
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg	65	70	75
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala	85	90	95
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg	100	105	110

<210> 15
 <211> 339
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética
 10 <400> 15

agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc	60
tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg ttttggacaa gagacgtggc	120
cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat	180
gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc	240
cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc	300
tacgacgccc ttcacatgca ggccttgccc cctcgctaa	339

15 <210> 16
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 16

25 **ggggsggggs ggggs**

15

<210> 17
 <211> 242
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

5 <400> 17

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

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

Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Met Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Lys
50 55 60

Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
65 70 75 80

Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ser Thr Met Ile Ala Thr Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys
130 135 140

Ser Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala
145 150 155 160

Ser Gln Asp Val Ile Thr Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
165 170 175

Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly
180 185 190

Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe
195 200 205

Thr Ile Ser Asn Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln
210 215 220
Gln His Tyr Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu
225 230 235 240

Leu Lys

10 <210> 18

ES 2 777 940 T3

<211> 726
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 18

tcccaggtcc aactgcagca gcctggggct gagctggtga ggcctggagc ttcagtgaag	60
ctgtcctgca aggcttcggg gtactccttc accacctact ggatgaactg ggtgaagcag	120
aggcctggac aaggccttga gtggattggc atgattcatc cttccgatag tgaaactagg	180
ttaaatacaga agttcaagga caaggccaca ttgactgtag acaaatactc cagcacagcc	240
tacatgcaac tcagcagccc gacatctgag gactctgcgg tctattactg tgcaagatct	300
actatgattg cgacgagggc tatggactac tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc	360
ggcgggtggcg gttctggtgg cgggtggctcc ggcgggtggcg gttctgacat tgtgatgacc	420
cagtctcaga aatccatgtc cacatcagta ggagacaggg tcagcatcac ctgcaaggcc	480
agtcaggatg ttattactgg tgtagcctgg tatcaacaga aaccagggca atctcctaaa	540
ttactgatatt actcggcatc ctaccggtag actggagtcc ctgatcgctt cactggcagt	600
ggatctggga cggatttcac ttccaccatc agcaatgtgc aggctgaaga cctggcagtt	660
tattactgtc agcaacatta tagtactcct ctcaatttcg gtgctgggac caagctggag	720
10 ctgaaa	726

<210> 19
 <211> 107
 <212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

20 <400> 19

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Gln	Lys	Ser	Met	Ser	Thr	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	

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

ES 2 777 940 T3

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Asn Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 20

<211> 119

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 20

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

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

Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Pro Asp Gly Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

15 <210> 21

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

ES 2 777 940 T3

<223> Construcción sintética

<400> 21

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
5 100 105

<210> 22

<211> 121

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

15 <400> 22

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

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

Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Lys Phe
50 55 60

ES 2 777 940 T3

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Lys Val Tyr Tyr Gly Ser Asn Pro Phe Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 23

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 23

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

Gly Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Asp His Ile Asn Asn Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Ser Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Lys Asp Tyr Thr Leu Ser Ile Thr Ser Leu Gln Thr
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Ser Thr Pro Trp
85 90 95

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

15 <210> 24

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Construcción sintética

<400> 24

ES 2 777 940 T3

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Lys Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Val Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Thr Met Ile Ala Thr Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 25

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 25

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

Glu Lys Val Thr Ile Arg Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Asp Asp
20 25 30

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Ser Glu Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Val Phe Thr Ile Glu Asn Met Leu Ser
65 70 75 80
Glu Asp Val Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Leu
85 90 95

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

15

<210> 26

<211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 26

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
 20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Lys Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Val Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Thr Met Ile Ala Thr Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

10 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
 115

<210> 27
 <211> 108
 <212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

20 <400> 27

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

ES 2 777 940 T3

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Pro
85 90 95

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

<210> 28

<211> 459

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 28

Met Gly Trp Ser Ser Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
35 40 45

Thr Thr Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Met Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Arg Leu Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

ES 2 777 940 T3

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Met Ile Ala Thr Arg Ala Met Asp Tyr
 115 120 125
 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser
 145 150 155 160
 Gln Lys Ser Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys
 165 170 175
 Lys Ala Ser Gln Asp Val Ile Thr Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 180 185 190
 Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr
 195 200 205
 Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 210 215 220
 Thr Phe Thr Ile Ser Asn Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr
 225 230 235 240
 Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
 245 250 255
 Leu Glu Leu Lys Leu Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 260 265 270
 Pro Pro Cys Pro Asp Pro Lys Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly
 275 280 285
 Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe
 290 295 300
 Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn
 305 310 315 320
 Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr
 325 330 335
 Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser
 340 345 350
 Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
 355 360 365

ES 2 777 940 T3

Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
370 375 380

Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
385 390 395 400

Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
405 410 415

Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
420 425 430

His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
435 440 445

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
450 455

<210> 29

<211> 1380

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 29

atgggatgga gctctatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccactcccag	60
gtccaactgc agcagcctgg ggctgagctg gtgaggcctg gagcttcagt gaagctgtcc	120
tgcaaggcct cggggctactc cttcaccacc tactggatga actgggtgaa gcagaggcct	180
ggacaaggcc ttgagtggat tggcatgatt catccttccg atagtgaac taggttaa	240
cagaagttca aggacaaggc cacattgact gtagacaaat cctccagcac agcctacatg	300
caactcagca gcccgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag atctactatg	360
attgcgacga gggctatgga ctactggggg caaggaacct cagtcaccgt ctccggcggg	420
ggcgggttctg gtggcggtgg ctccggcggg gccgggttctg acattgtgat gaccagctct	480
cagaaatcca tgtccacatc agtaggagac agggtcagca tcacctgcaa ggccagtcag	540
gatgttatta ctggtgtagc ctggtatcaa cagaaaccag ggcaatctcc taaattactg	600
atttactcgg catcctaccg gtacactgga gtccctgatc gcttcactgg cagtggatct	660
gggacggatt tcactttcac catcagcaat gtgcaggctg aagacctggc agtttattac	720
tgtcagcaac attatagtag tcctctcact ttcgggtgctg ggaccaagct ggagctgaaa	780
ctcgagccca aatcttgtga caaaactcac acatgccac cgtgcccgga tcccaaattt	840
tgggtgctgg tgggtggttg tggagtcctg gcttgctata gcttgctagt aacagtggcc	900

ES 2 777 940 T3

tttattat	ttt	tctgggtgag	gagtaagagg	agcaggctcc	tgcacagtga	ctacatgaac	960
atgactccc	gccgccccgg	gcccacccgc	aagcattacc	agccctatgc	cccaccacgc		1020
gacttcgcag	cctatcgctc	cagagtgaag	ttcagcagga	gcgcagacgc	ccccgcgtac		1080
cagcagggcc	agaaccagct	ctataacgag	ctcaatctag	gacgaagaga	ggagtacgat		1140
gttttggaca	agagacgtgg	ccgggaccct	gagatggggg	gaaagccgag	aaggaagaac		1200
cctcaggaag	gcctgtacaa	tgaactgcag	aaagataaga	tggcggaggc	ctacagtgag		1260
attgggatga	aaggcgagcg	ccggaggggc	aaggggcacg	atggccttta	ccaggggtctc		1320
agtacagcca	ccaaggacac	ctacgacgcc	cttcacatgc	aggccctgcc	ccctcgctaa		1380

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido del receptor de antígeno quimérico (CAR), que comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana, un dominio de señalización intracelular y una región de señalización coestimuladora, **caracterizado porque** el dominio de unión a antígeno es un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) de un anticuerpo que se une específicamente a CS1.
2. El polipéptido de la reivindicación 1, donde la región de señalización coestimuladora comprende el dominio citoplasmático de una molécula coestimuladora seleccionada de entre el grupo que consiste en CD28 y 4-1BB.
3. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde el polipéptido de CAR está definido por la fórmula:

SP-CS1-HG-TM-CSR-ISR;

- donde "SP" representa un péptido señal,
donde "CS1" representa un dominio de unión al antígeno CS1,
donde "HG" representa un dominio de bisagra opcional,
donde "TM" representa un dominio transmembrana,
- donde "CSR" representa una región de señalización coestimuladora,
donde "ISR" representa un dominio de señalización intracelular, y
donde "-" representa un enlazador bivalente.
4. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización CD3 zeta (CD3ζ).
5. Una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica el polipéptido recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Un vector que comprende la secuencia de ácido nucleico aislada de la reivindicación 5.
7. Una célula que comprende el vector de la reivindicación 6.
8. La célula de la reivindicación 7, donde la célula se selecciona de entre el grupo que consiste en una célula T y una célula asesina natural (NK).
9. Una célula T o una célula NK genéticamente modificada para expresar un polipéptido del receptor de antígeno quimérico (CAR) de la reivindicación 4, para su uso en el tratamiento del mieloma múltiple.
10. Las células de la reivindicación 9, para el uso de la reivindicación 9, donde dichas células proporcionan una inmunidad antitumoral en un mamífero con mieloma múltiple.
11. Las células de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, para el uso de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, donde la región de señalización coestimuladora comprende el dominio citoplasmático de una molécula coestimuladora seleccionada de entre el grupo que consiste en CD28 y 4-1BB.
12. Las células de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, para el uso de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, donde el polipéptido de CAR está definido por la fórmula:

SP-CS1-HG-TM-CSR-ISR;

- donde "SP" representa un péptido señal,
donde "CS1" representa un dominio de unión al antígeno CS1,
donde "HG" representa un dominio de bisagra opcional,
donde "TM" representa un dominio transmembrana,
donde "CSR" representa una región de señalización coestimuladora,
donde "ISR" representa un dominio de señalización intracelular, y
donde "-" representa un enlazador bivalente.

13. Las células de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, para el uso de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, donde el CAR comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 28, o una variante de la misma que tiene al menos un 65 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 28.
- 5 14. Las células de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, para el uso de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, donde el CAR está codificado por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 29, o una variante de la misma que tiene al menos un 65 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 29.

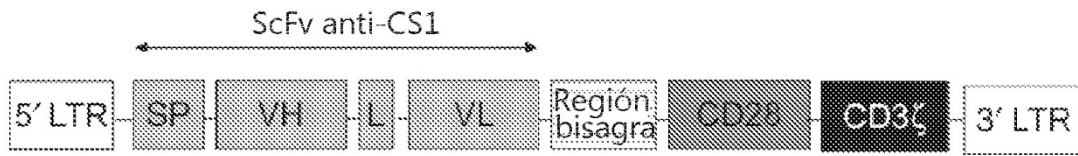


Figura 1A

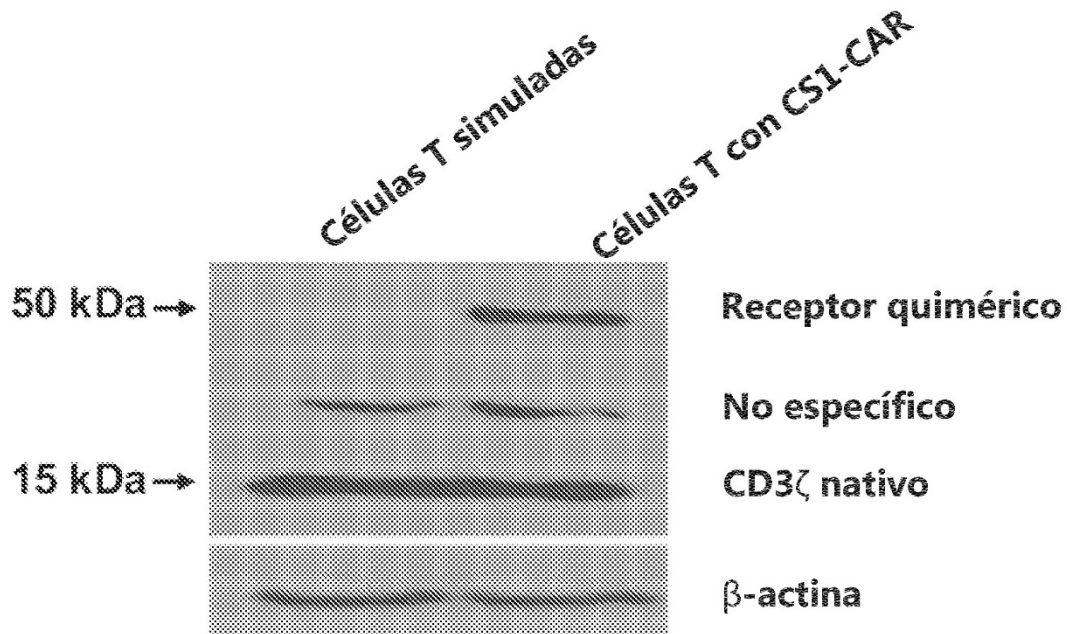


Figura 1B

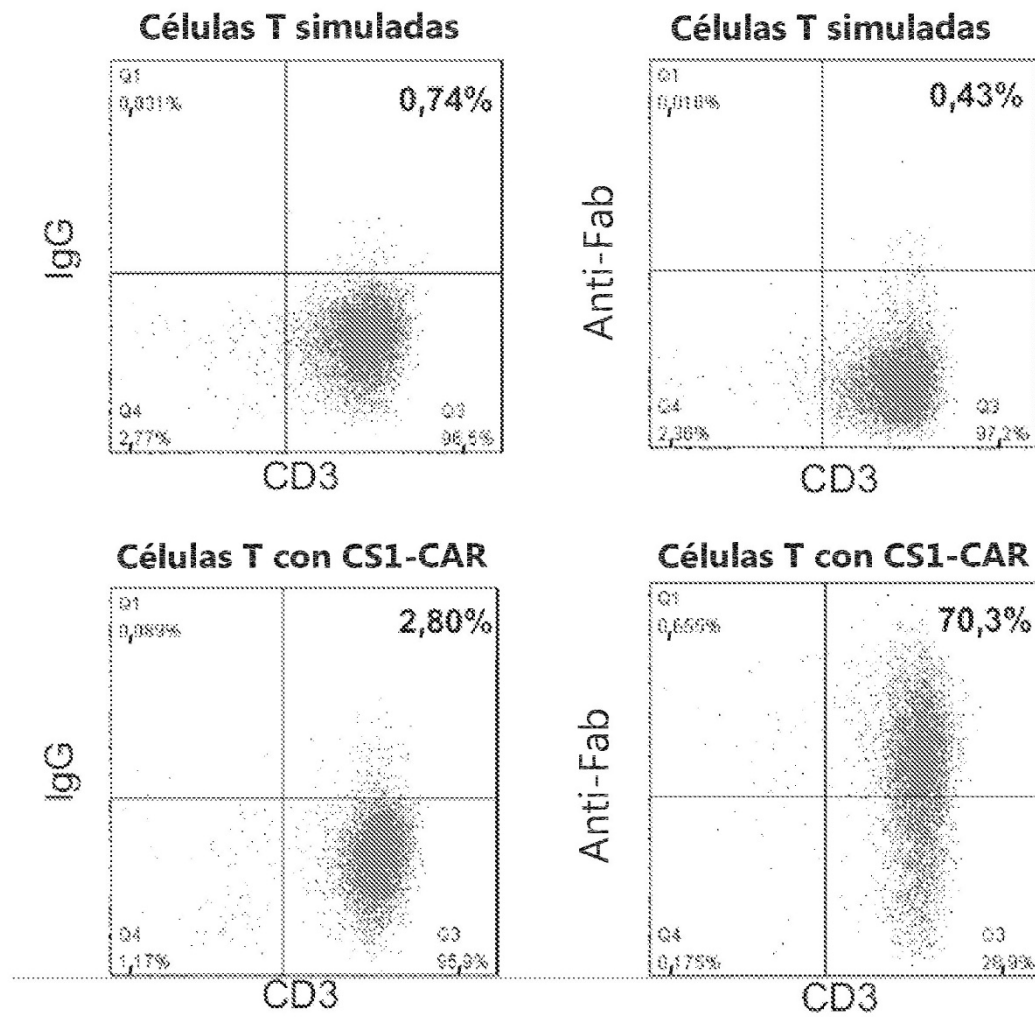


Figura 1C

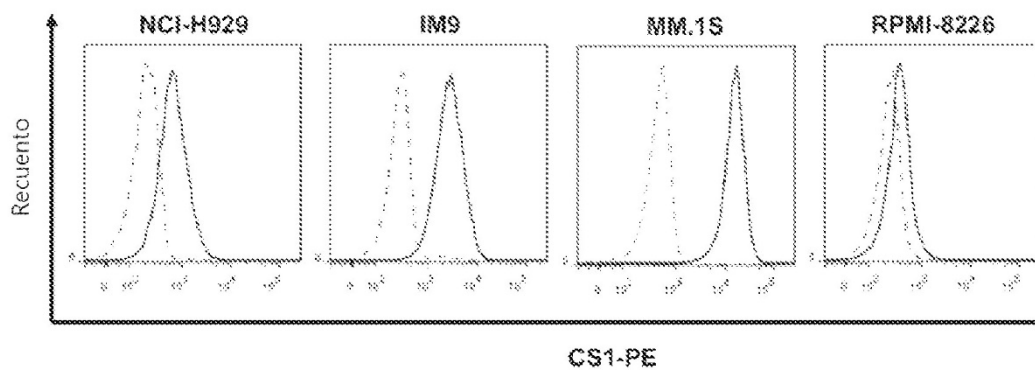


Figura 2A

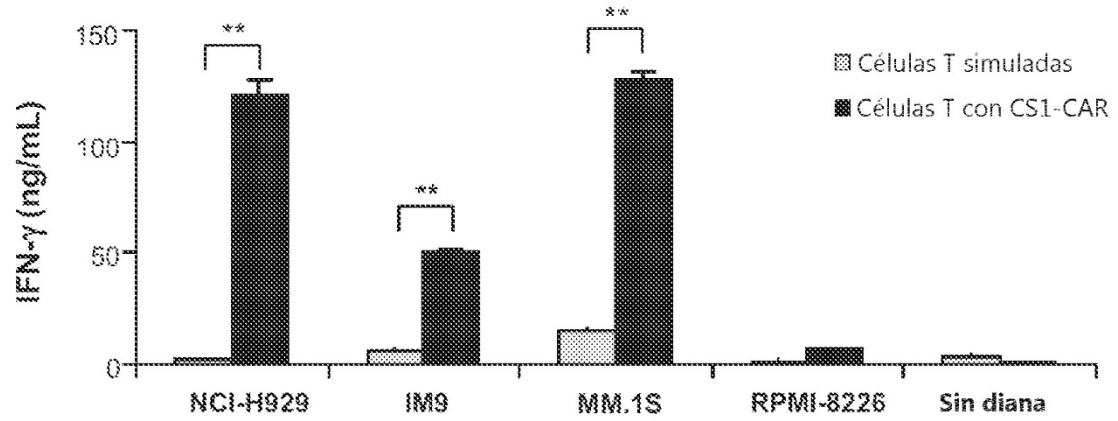


Figura 2B

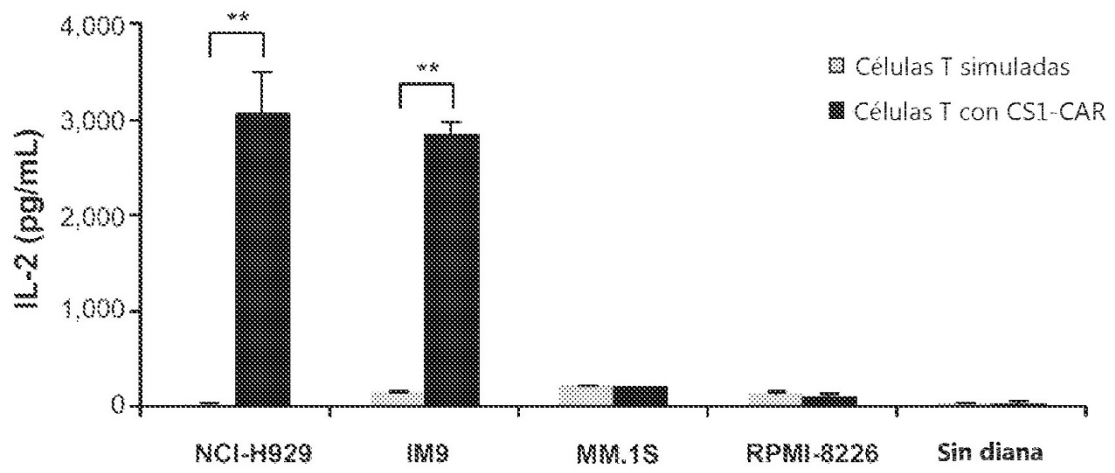


Figura 2C

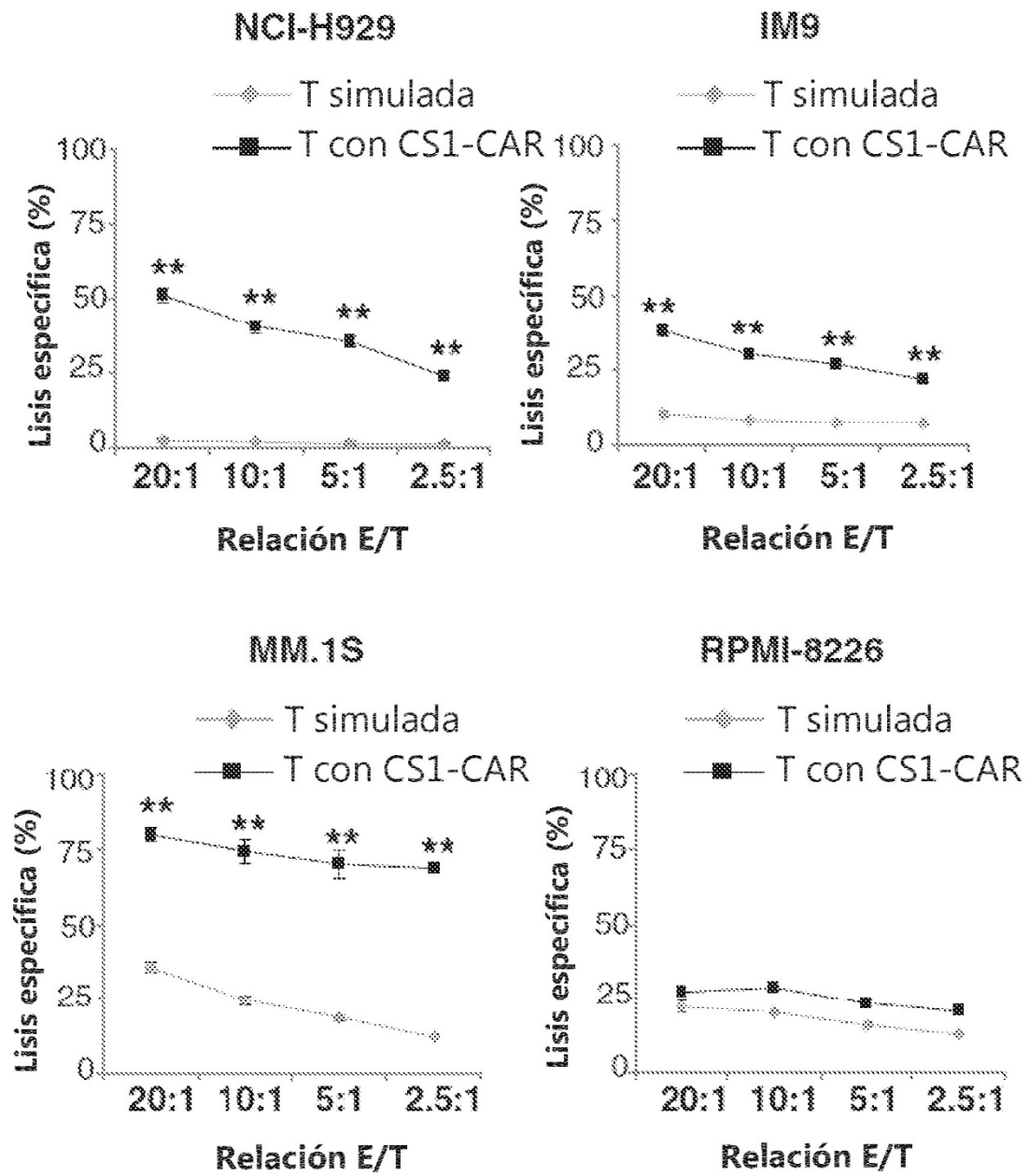


Figura 3A

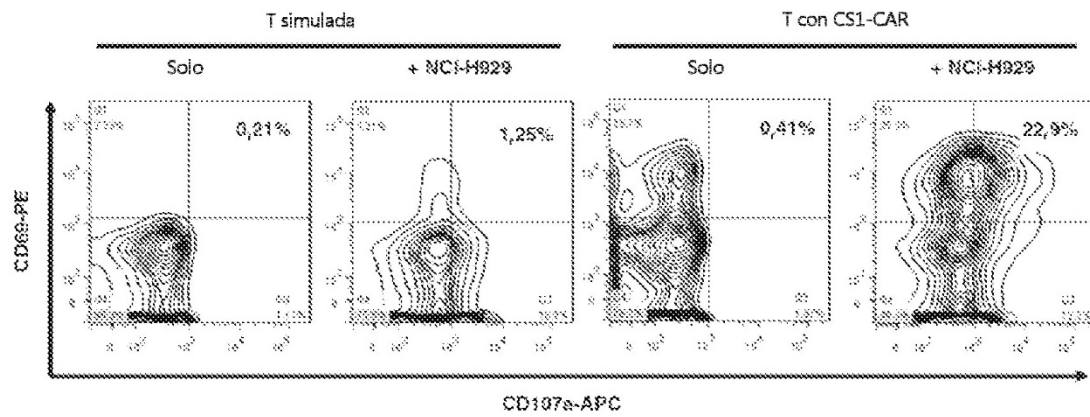


Figura 3B

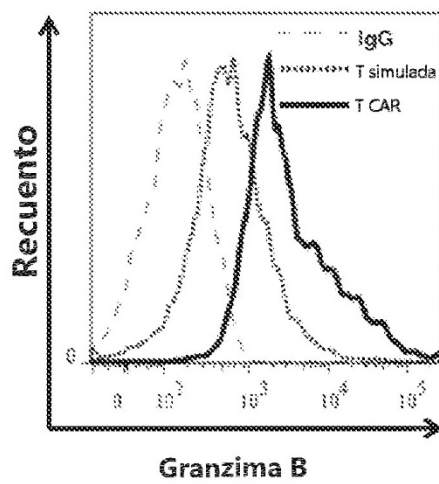


Figura 3C

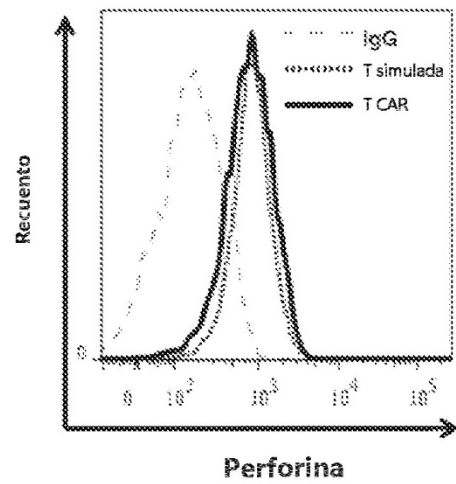


Figura 3D

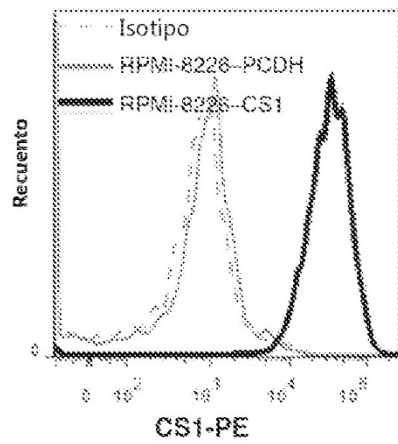


Figura 4A

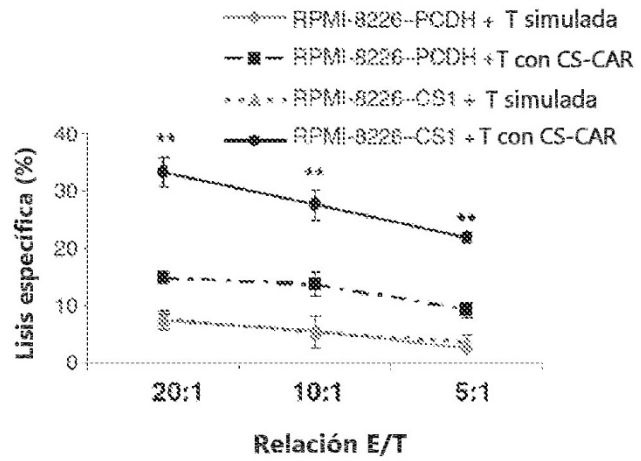


Figura 4B

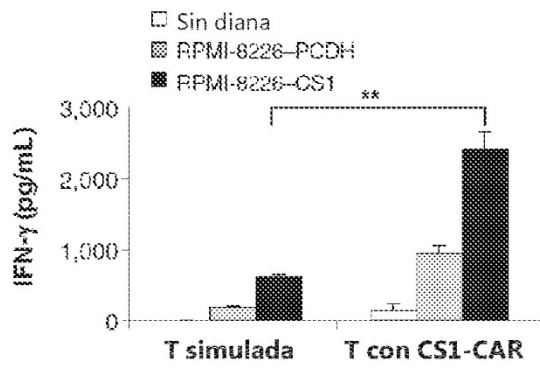


Figura 4C

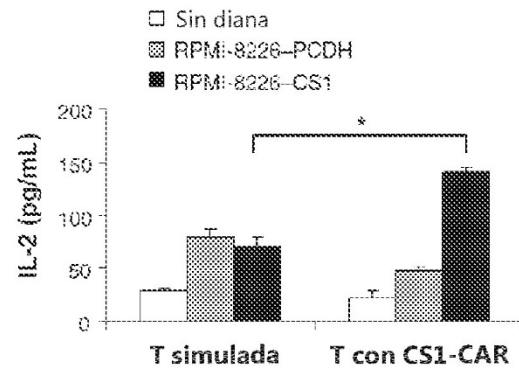
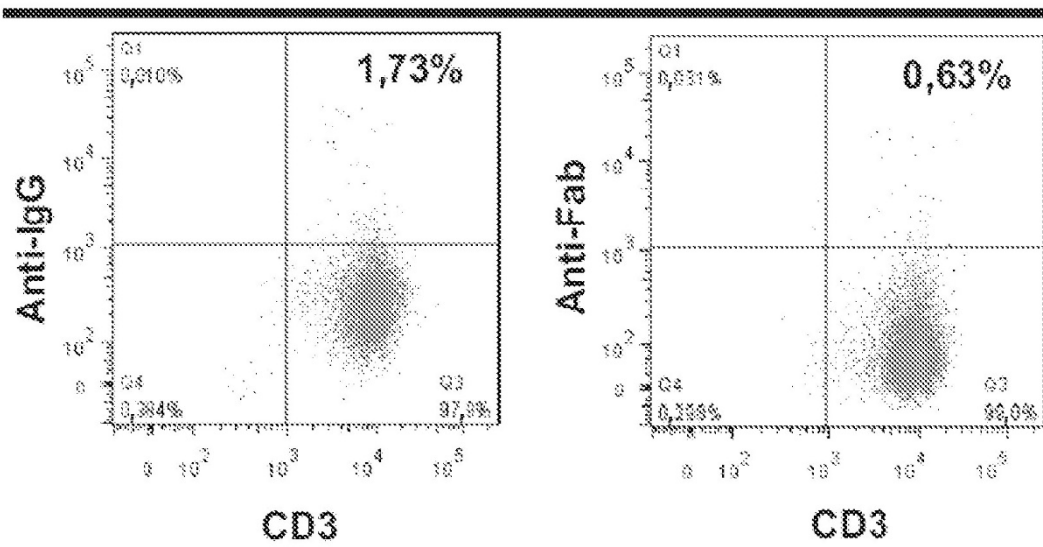


Figura 4D

T simulada



CS1-CAR T

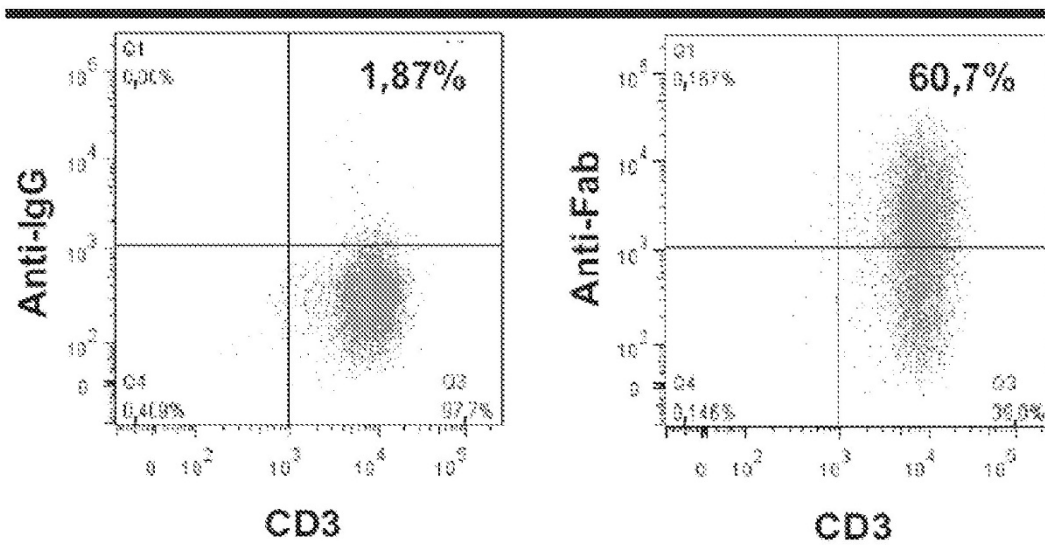


Figura 5A

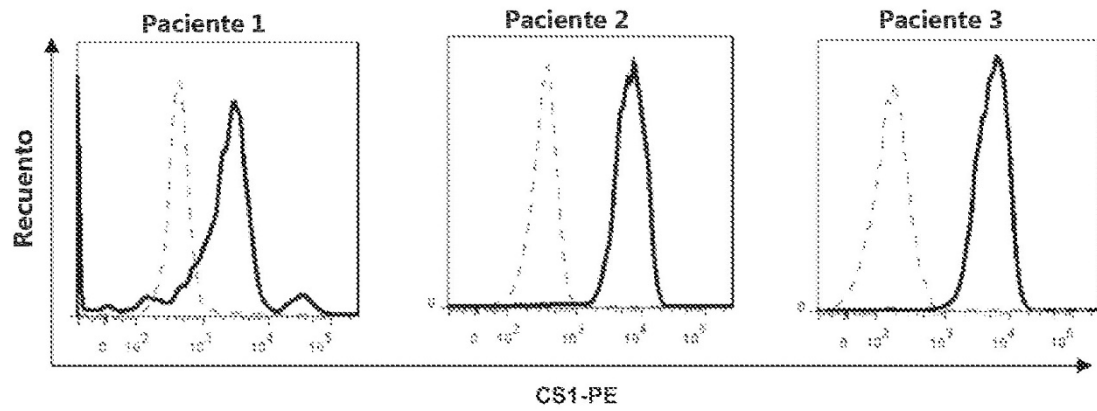


Figura 5B

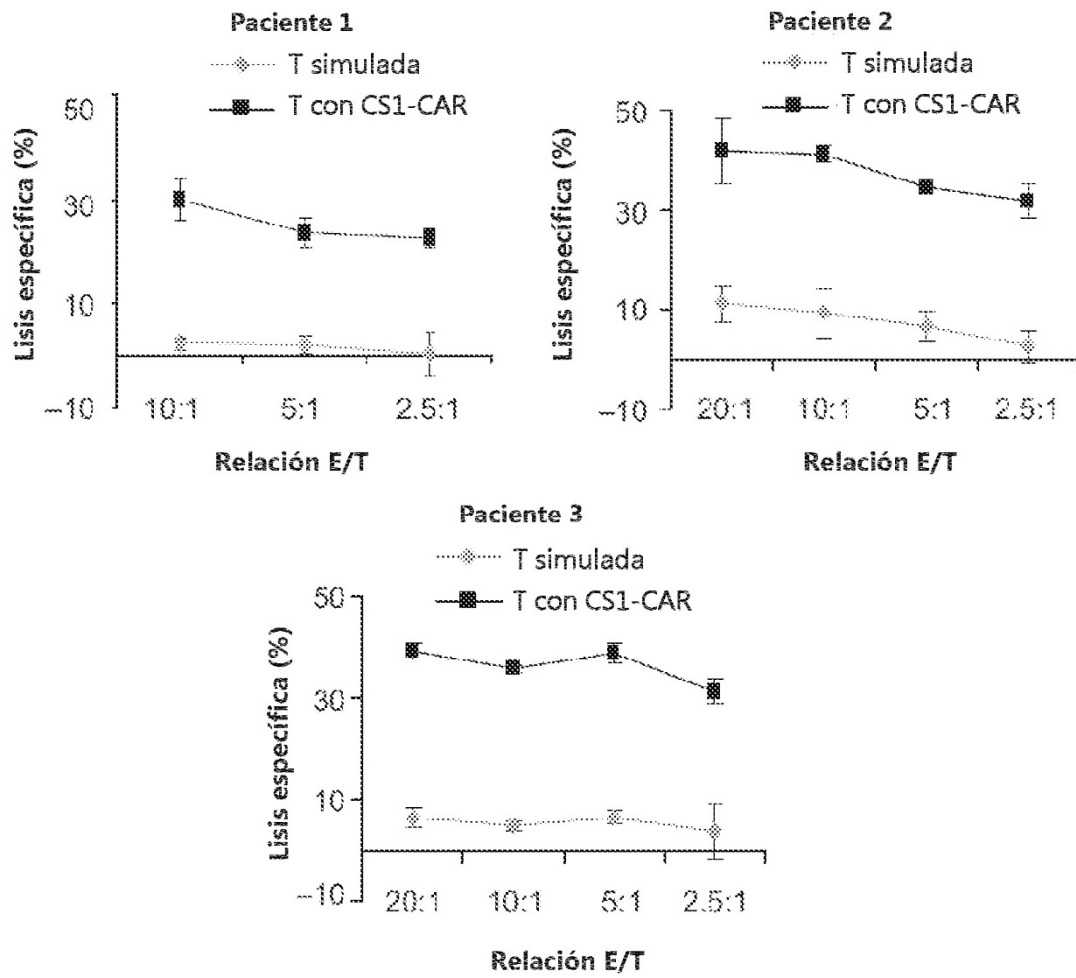


Figura 5C

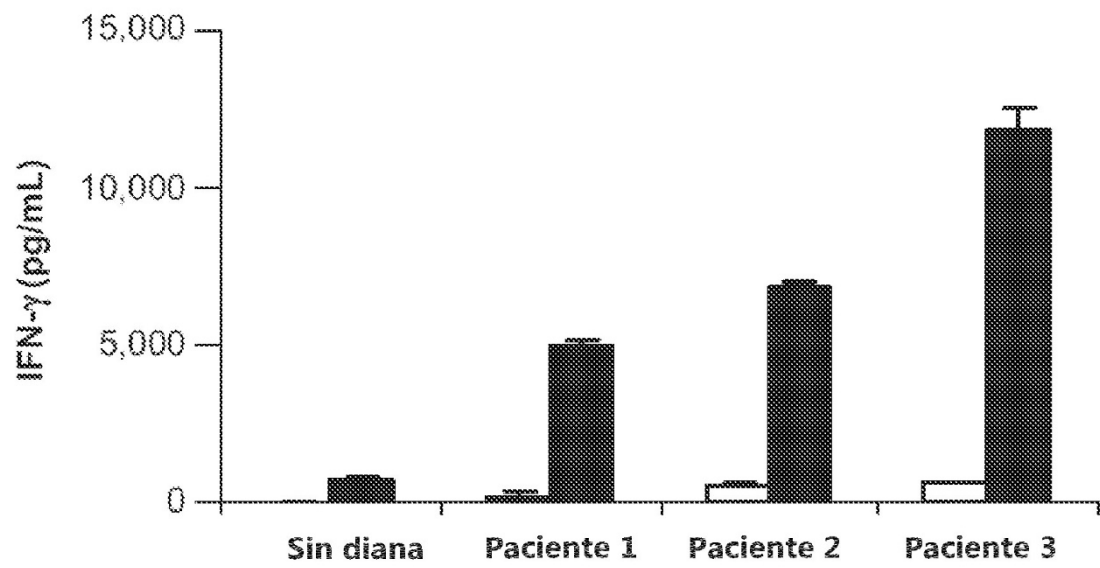


Figura 5D

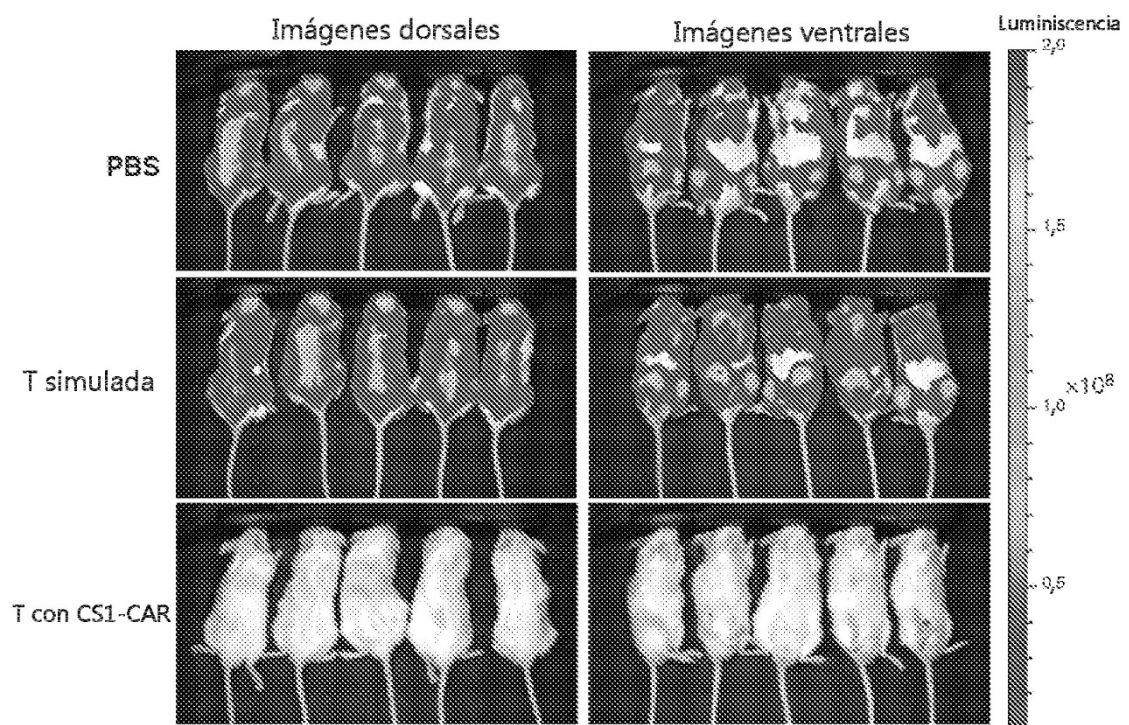


Figura 6A

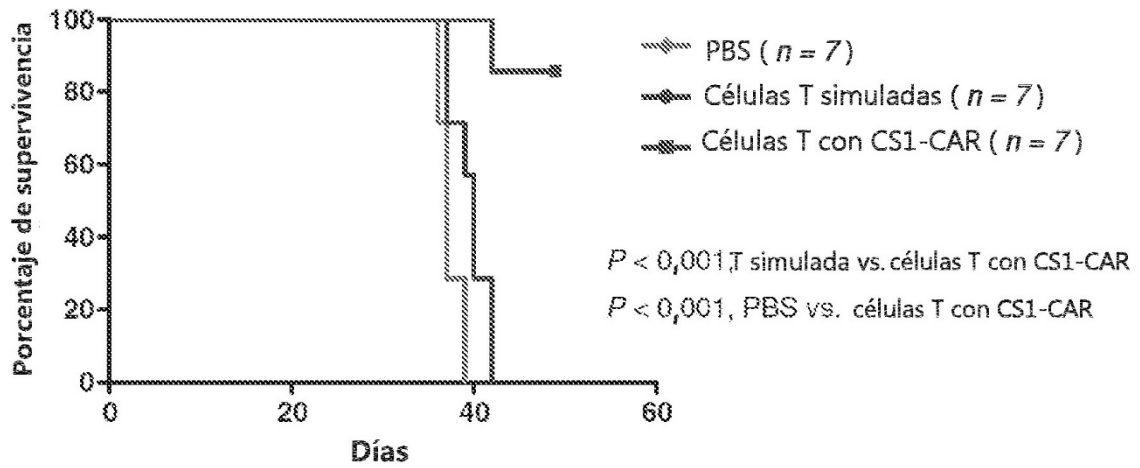


Figura 6B

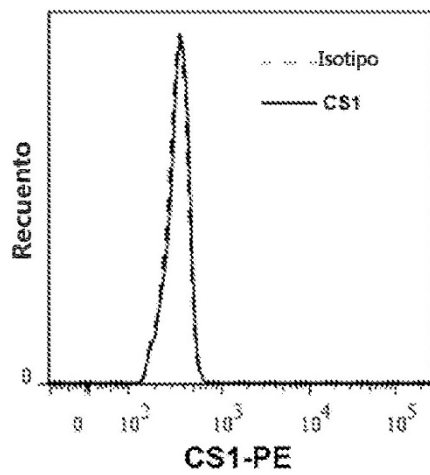


Figura 7A

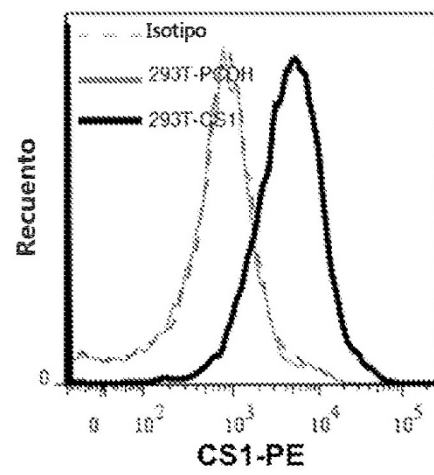


Figura 7B

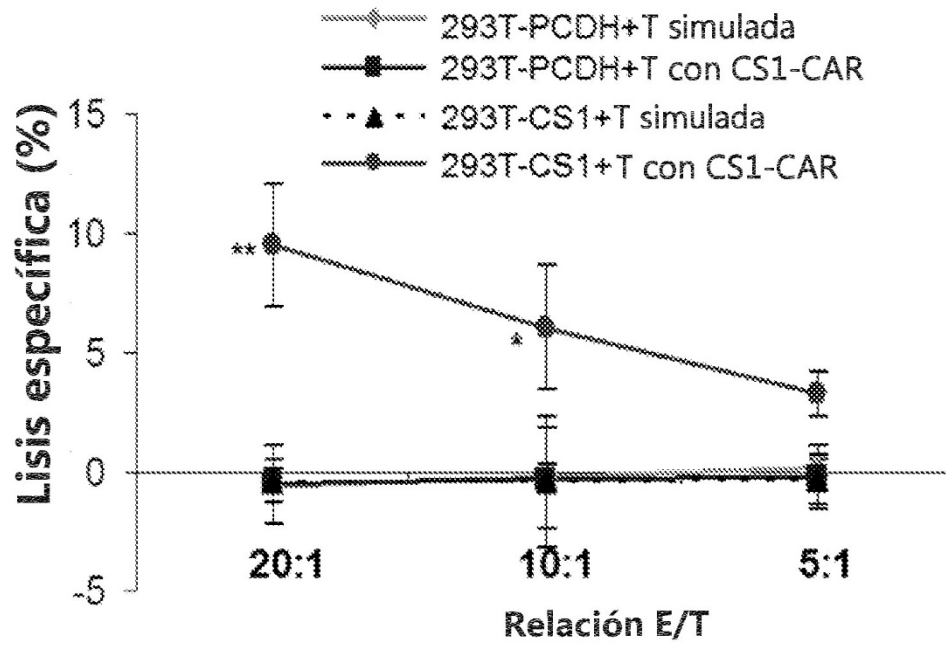


Figura 7C

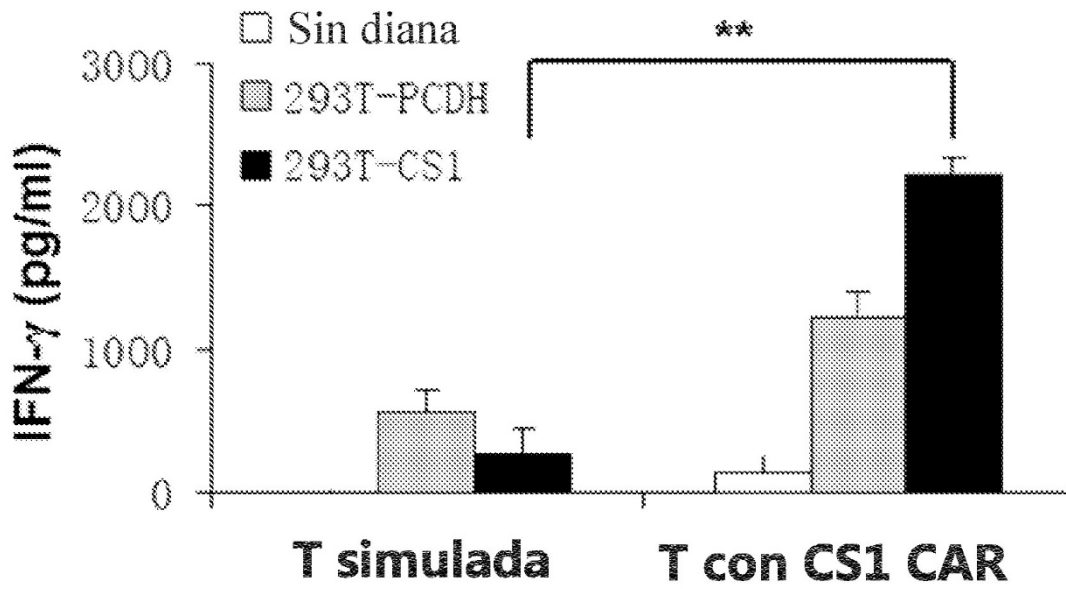


Figura 7D

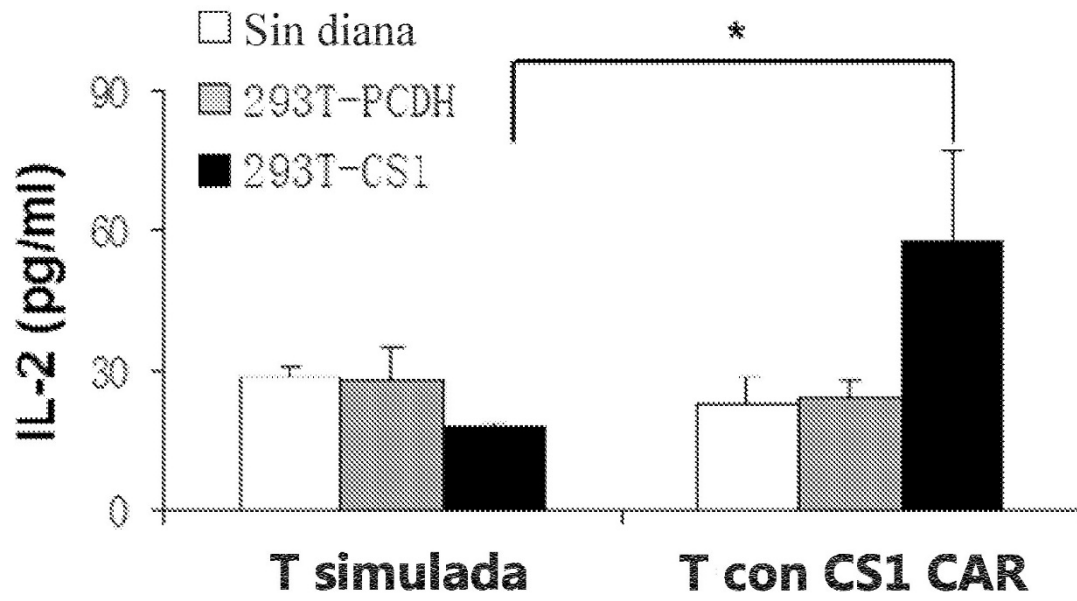


Figura 7E

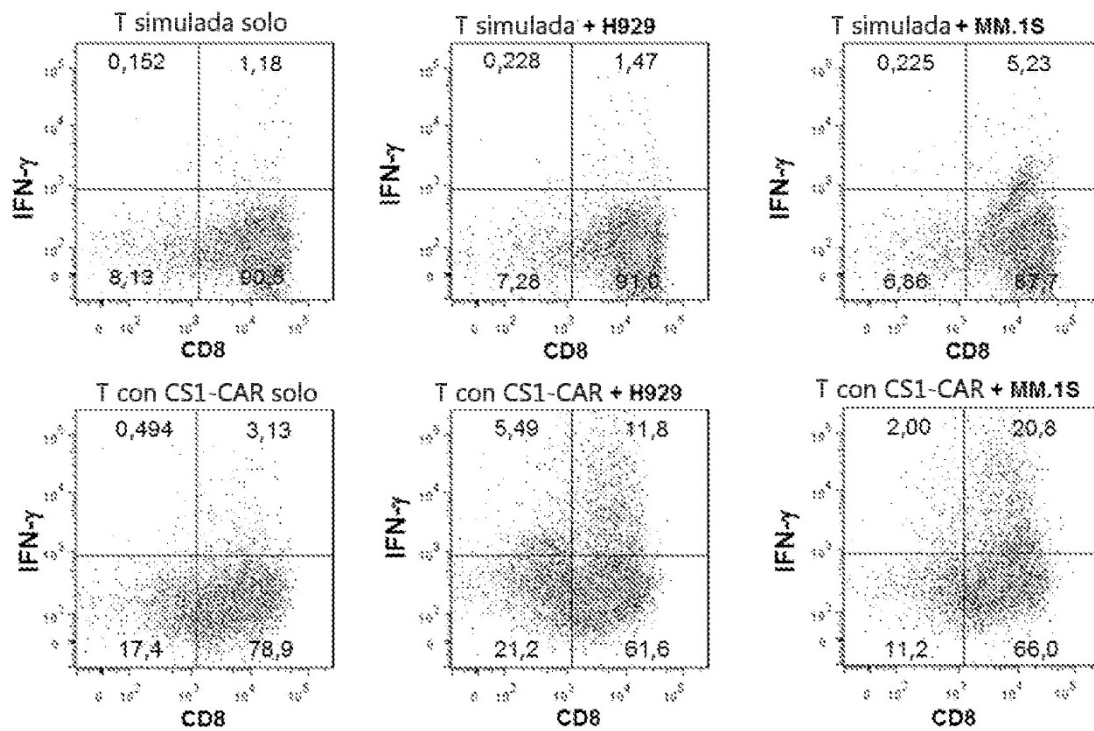


Figura 8A

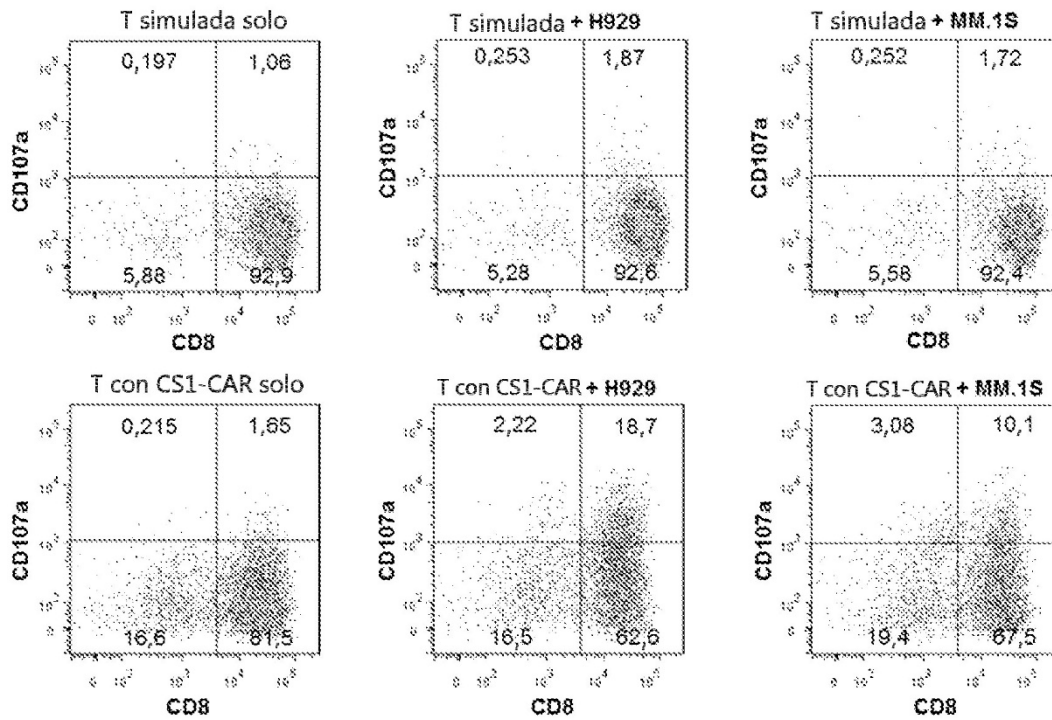


Figura 8B

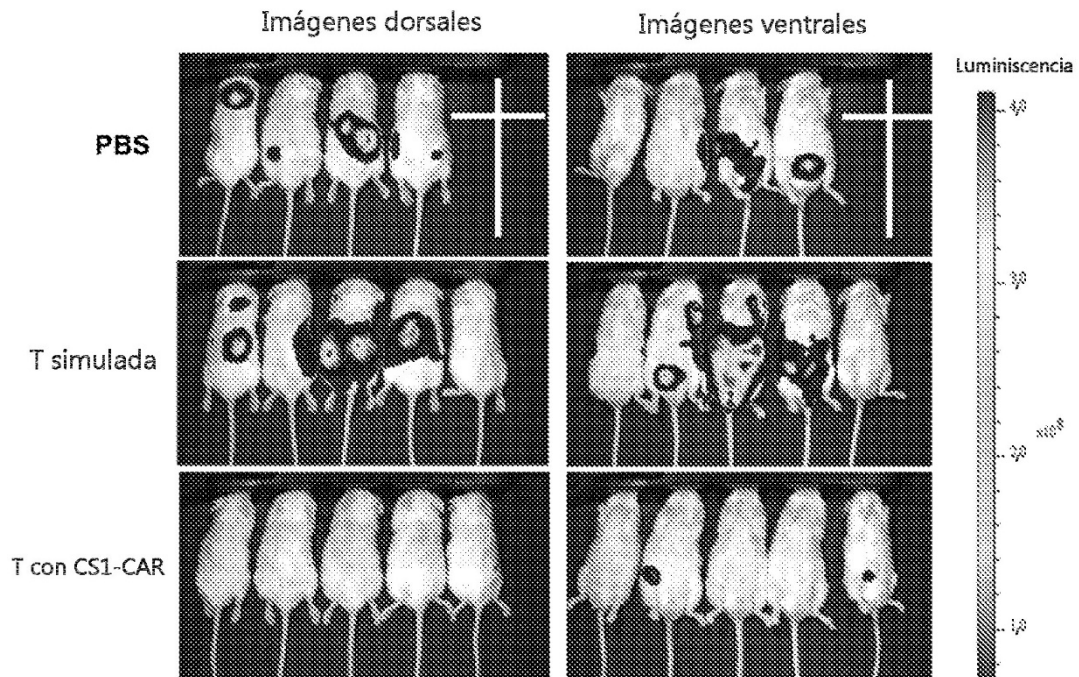


Figura 9A

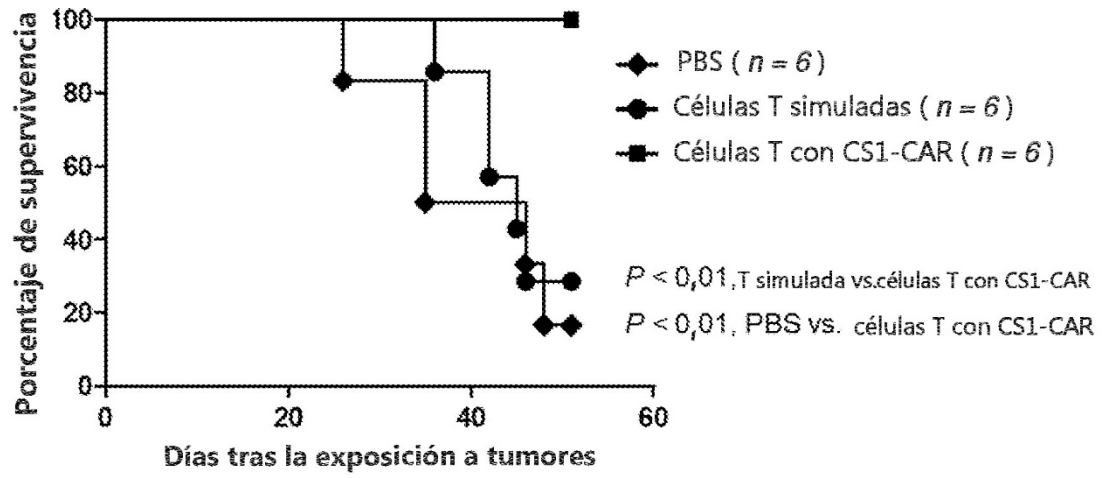


Figura 9B

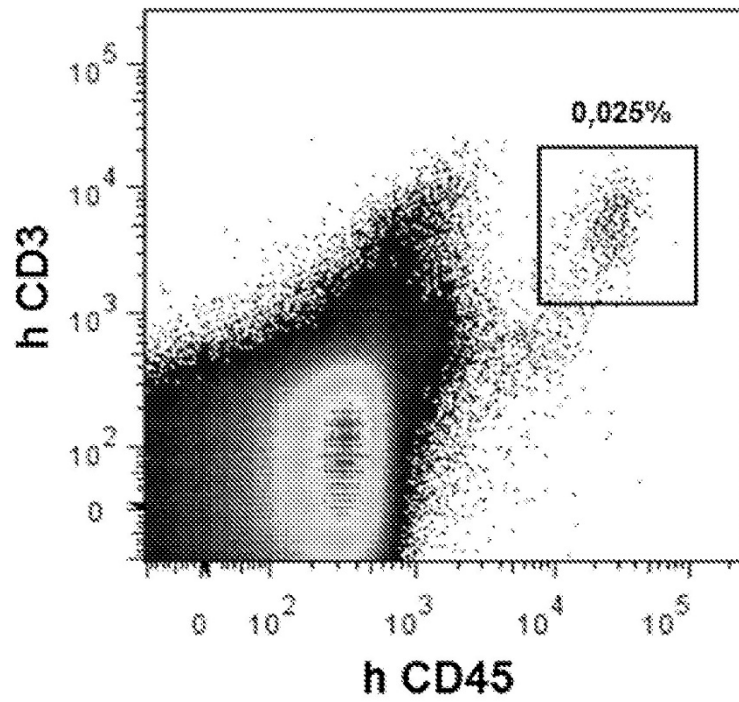


Figura 10A

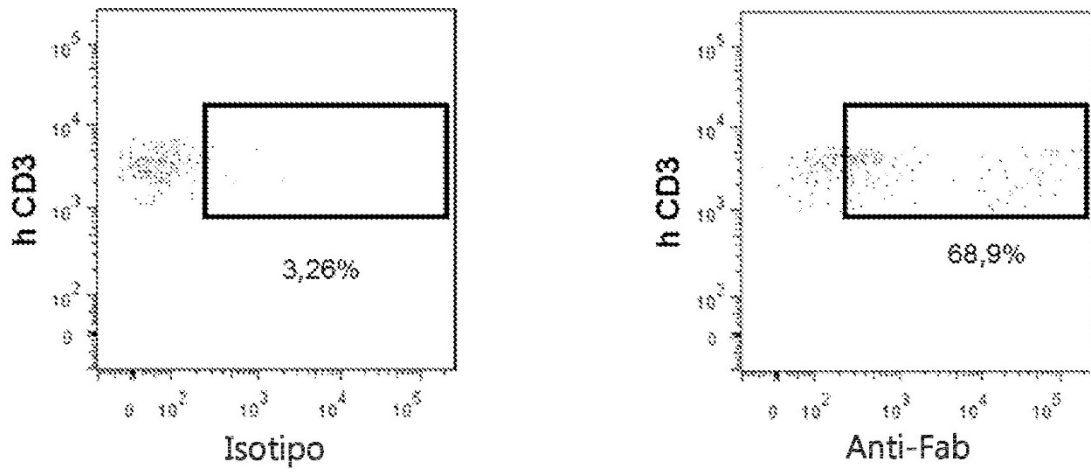


Figura 10B

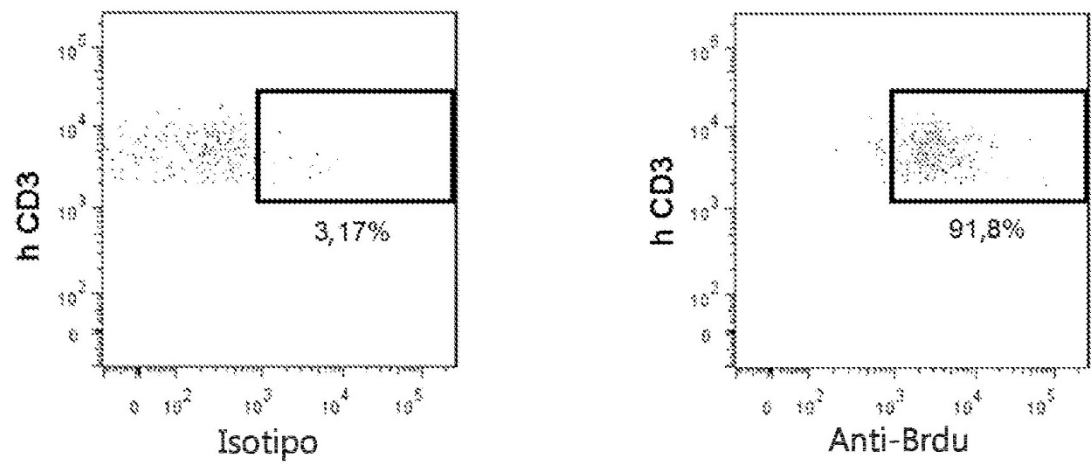


Figura 10C

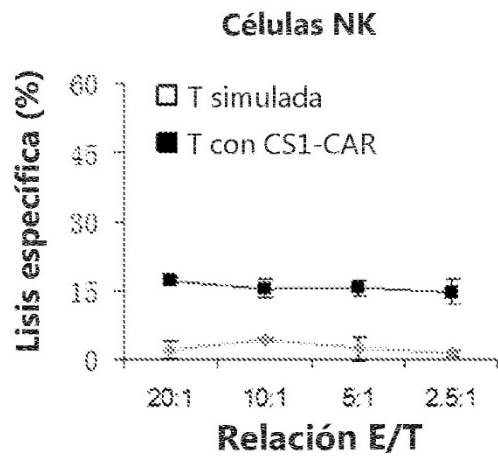


Figura 11A

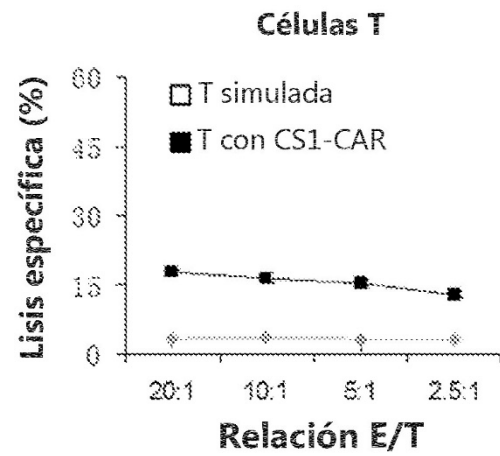


Figura 11B

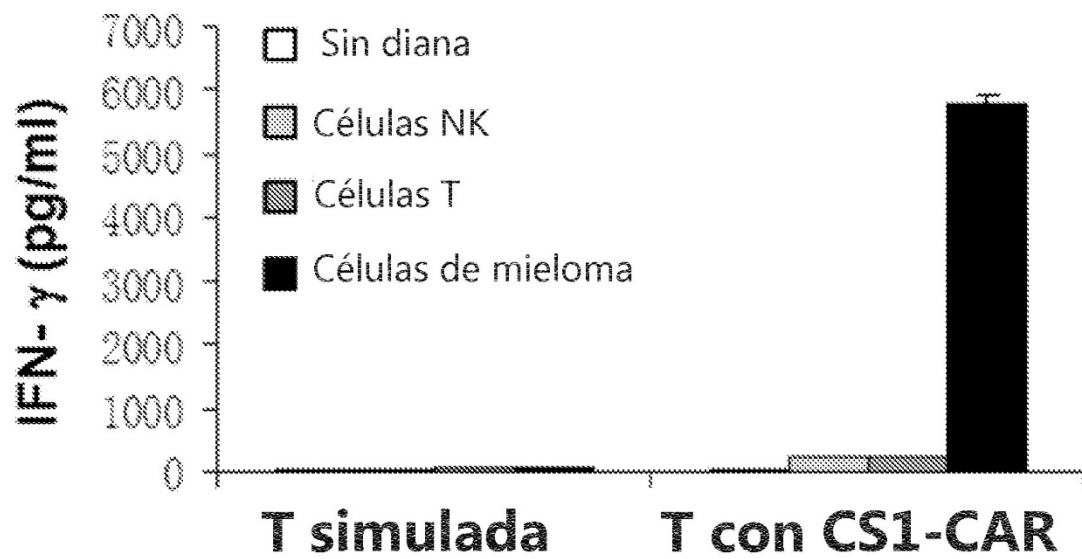


Figura 11C

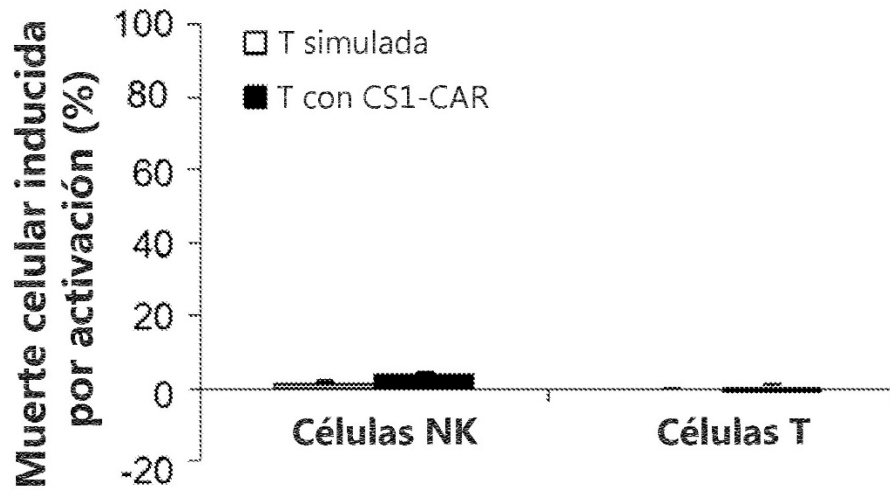


Figura 12

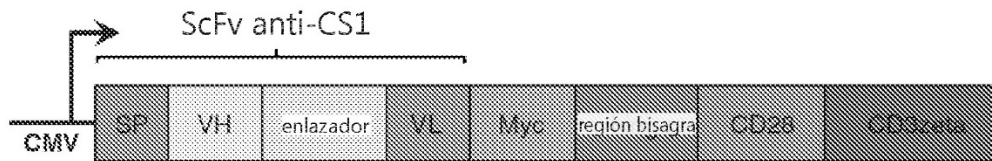


Figura 13A

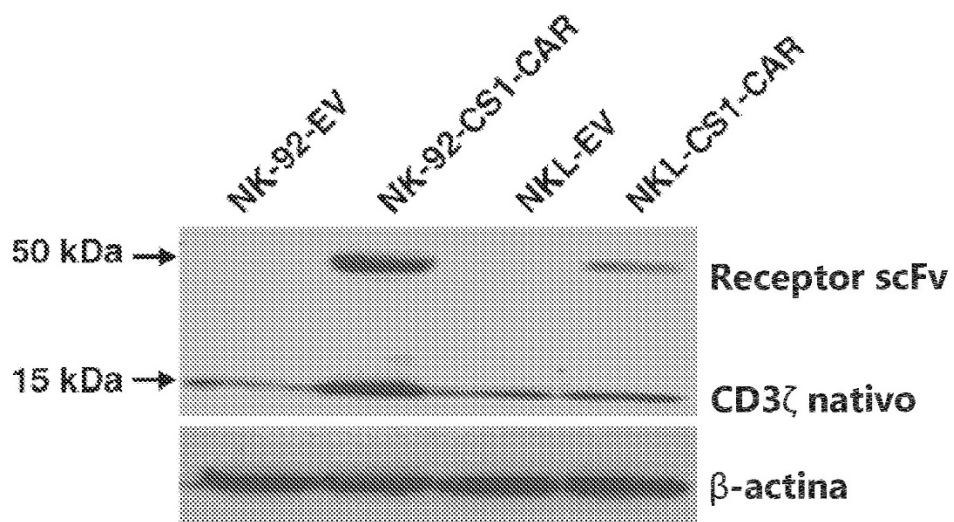


Figura 13B

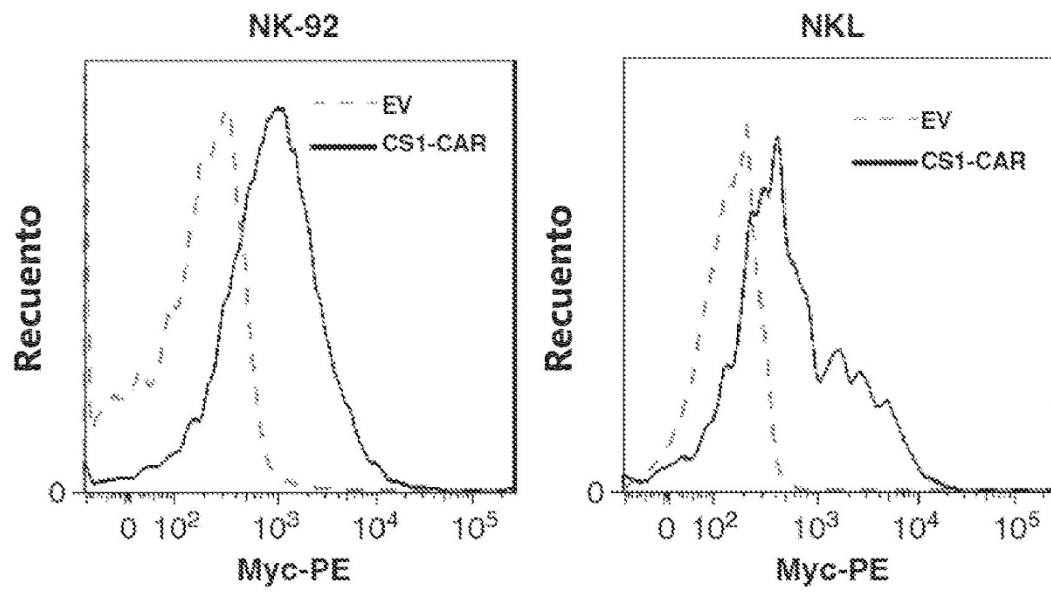


Figura 13C

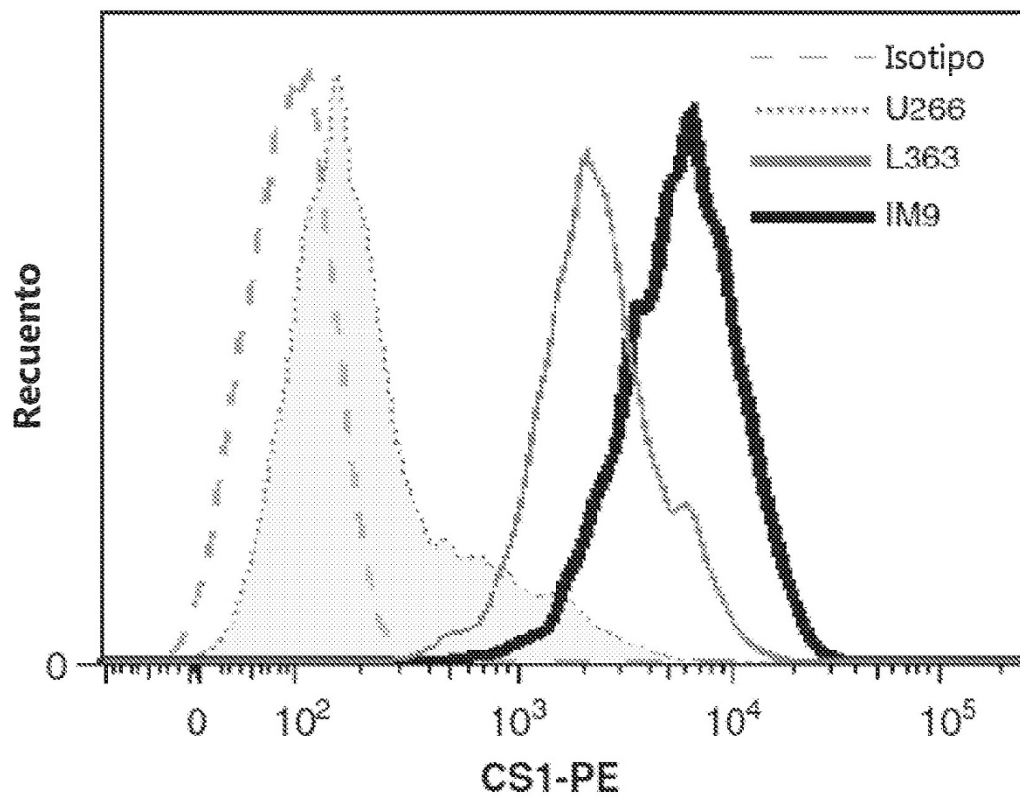


Figura 14A

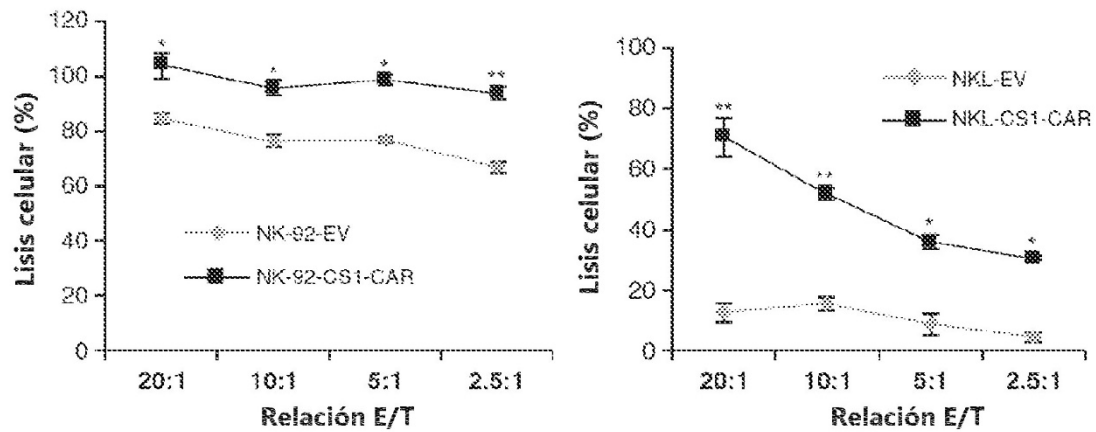


Figura 14B

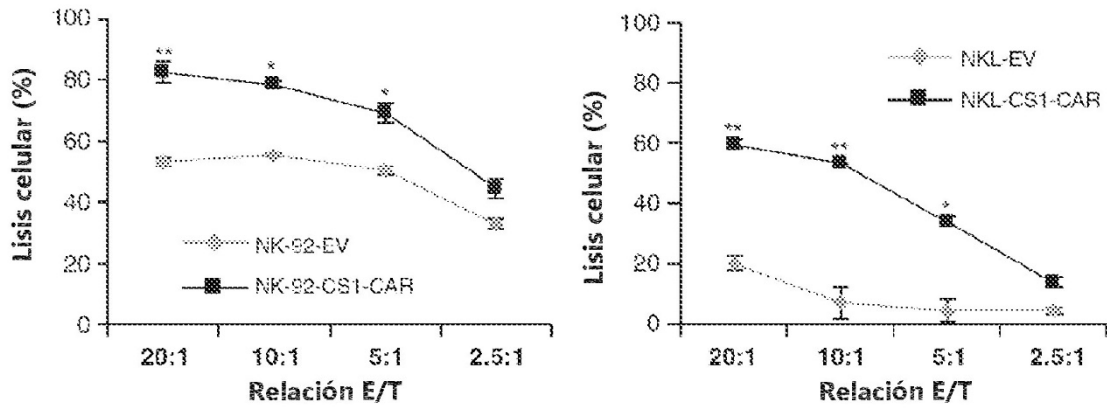


Figura 14C

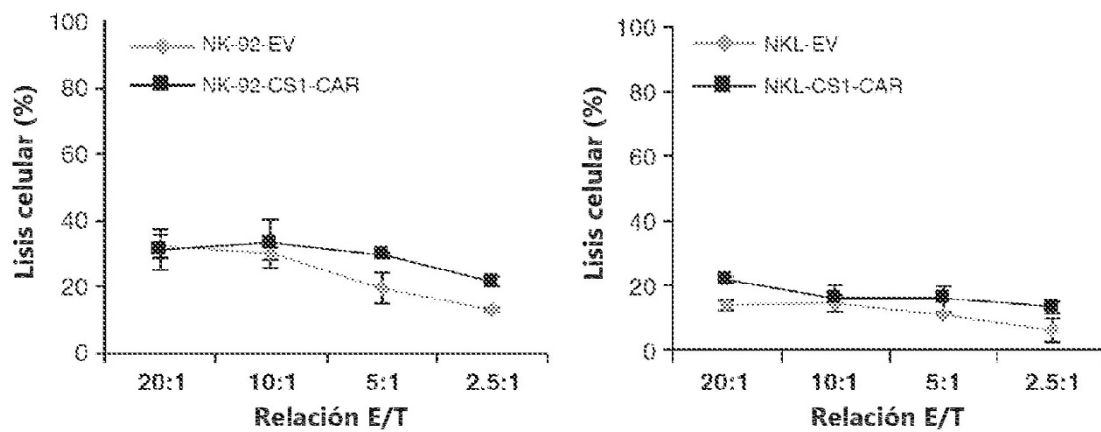


Figura 14D

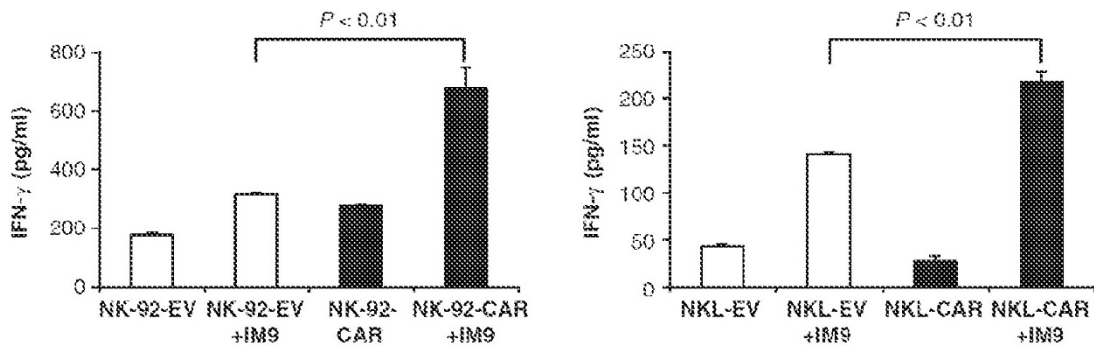


Figura 15A

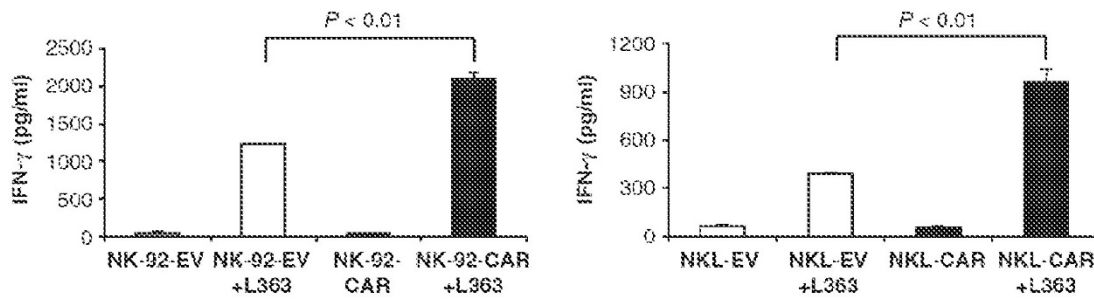


Figura 15B

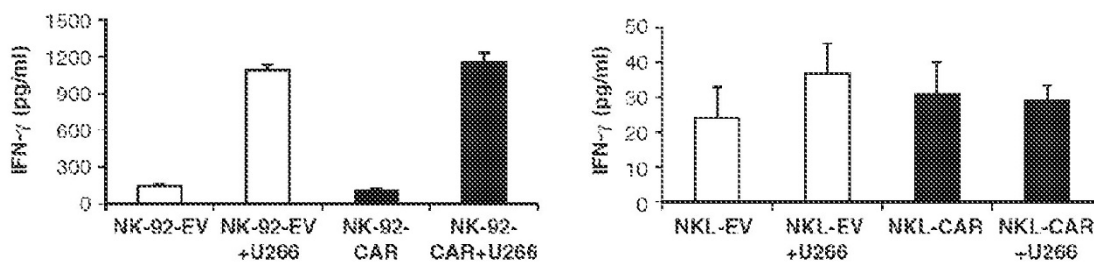


Figura 15C

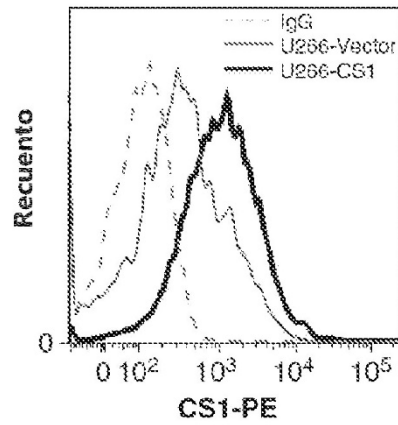


Figura 16A

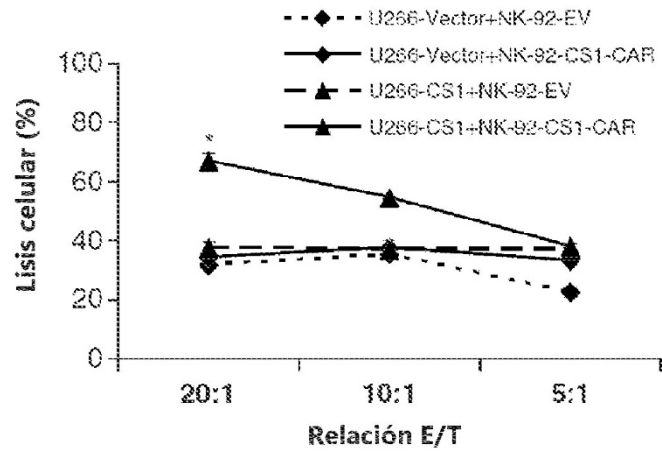


Figura 16B

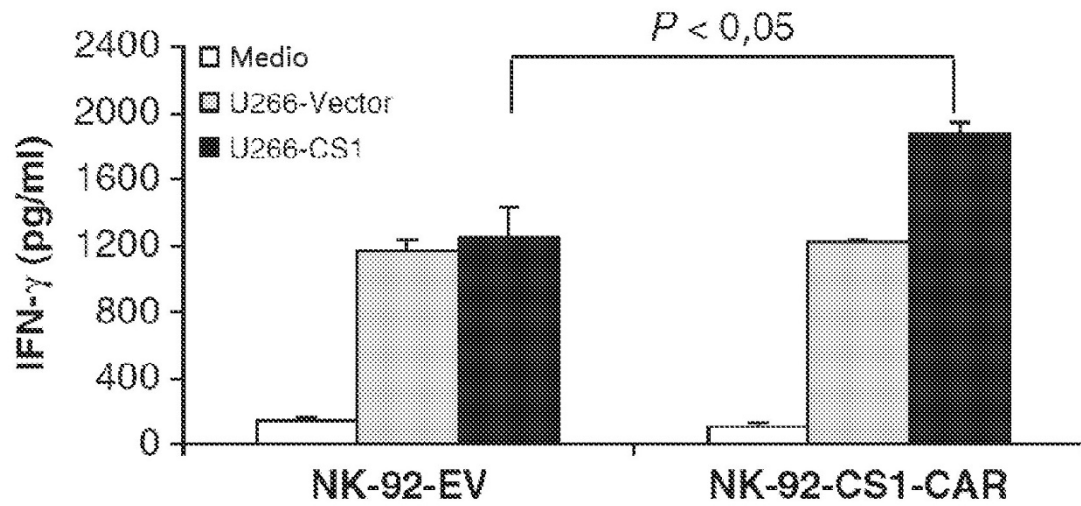


Figura 16C

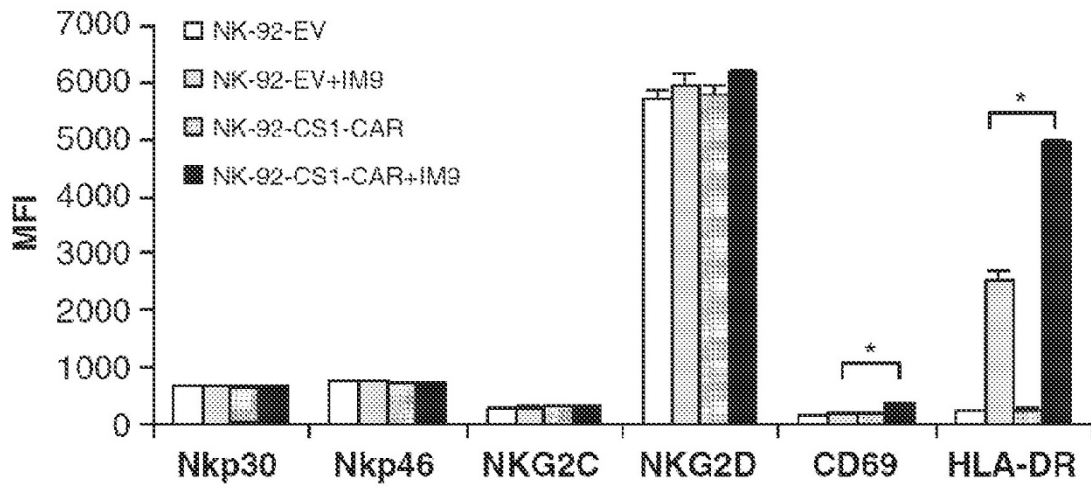


Figura 17A

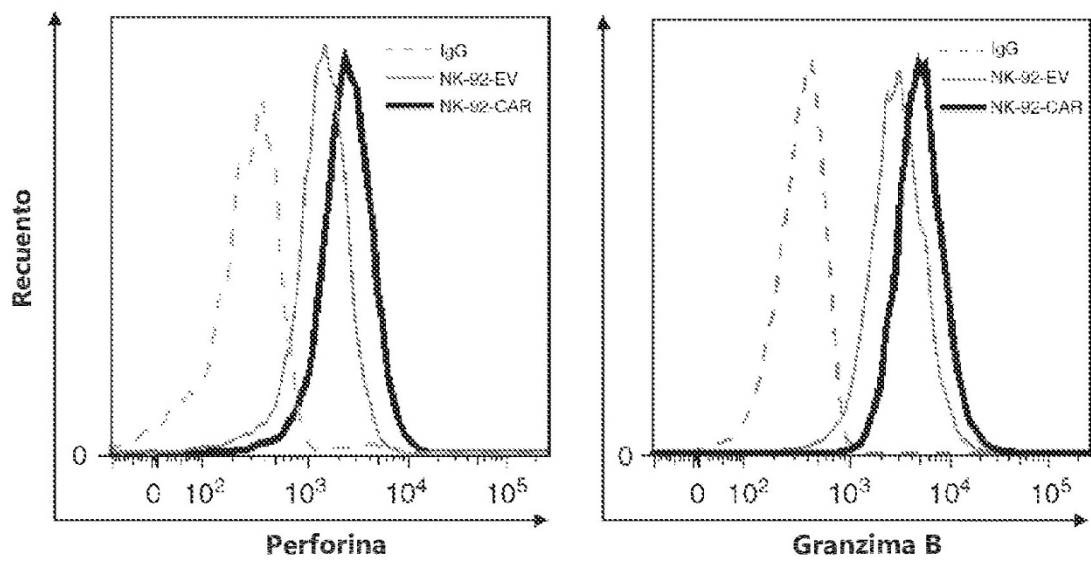


Figura 17B

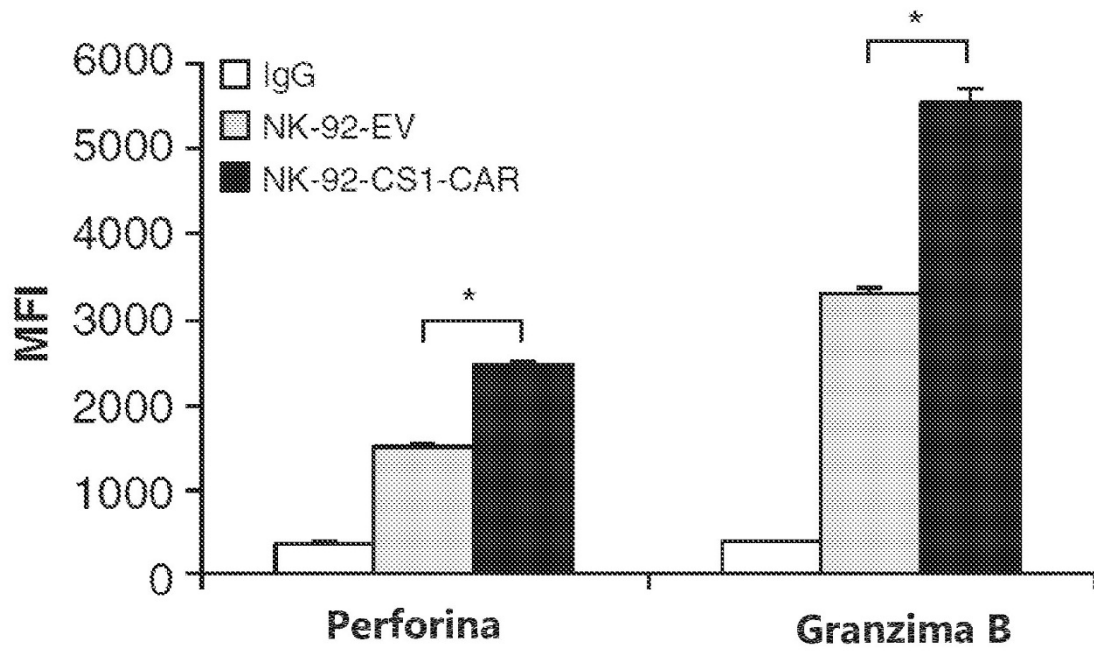


Figura 17C

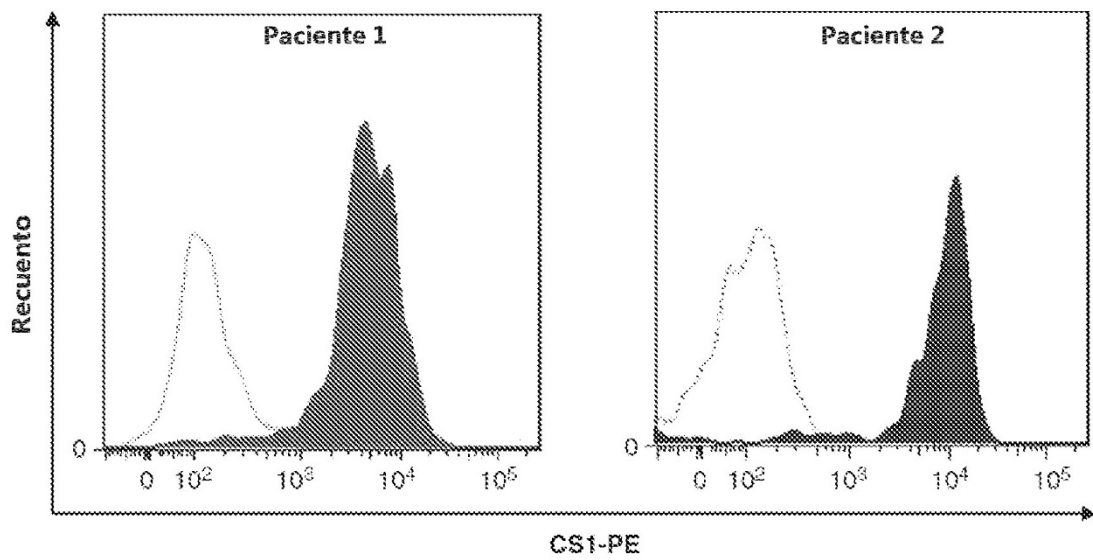


Figura 18A

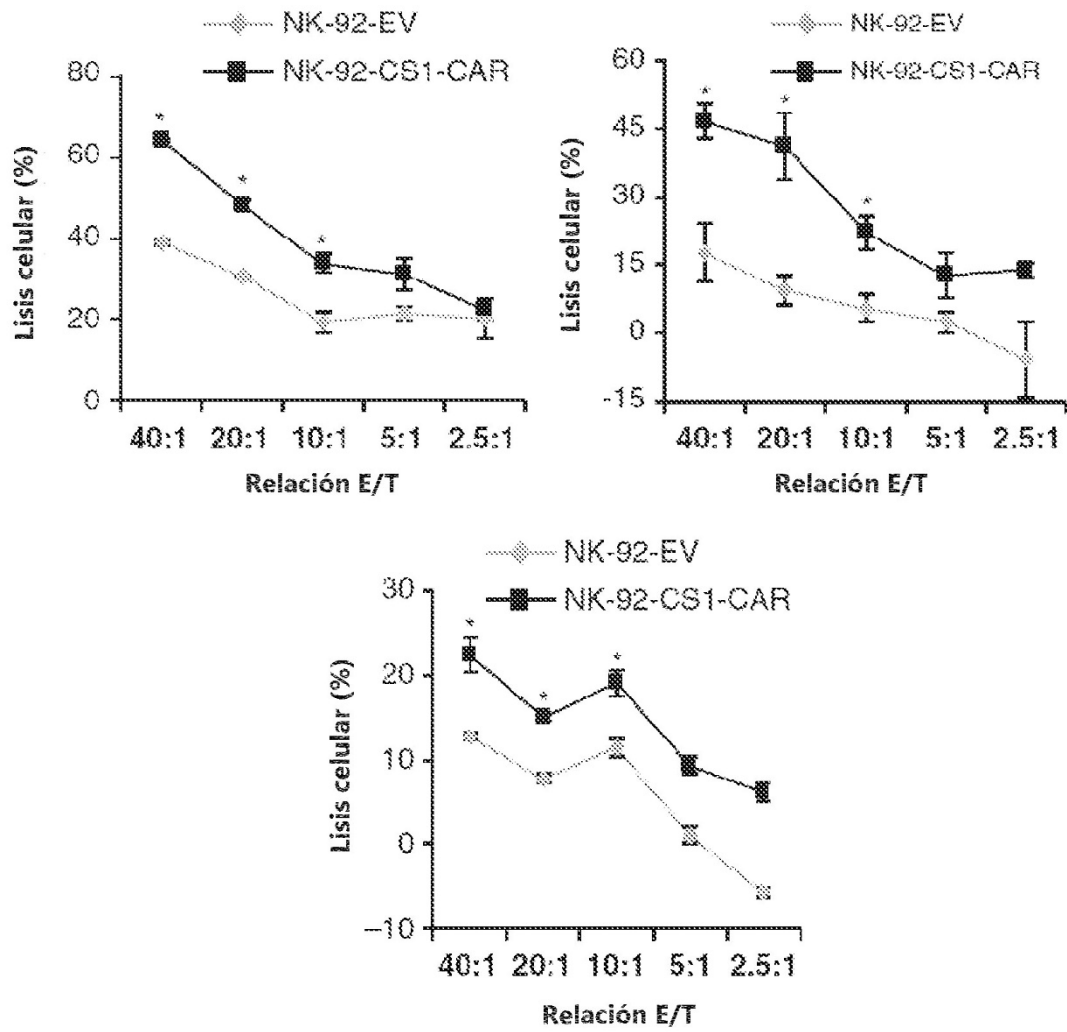


Figura 18B

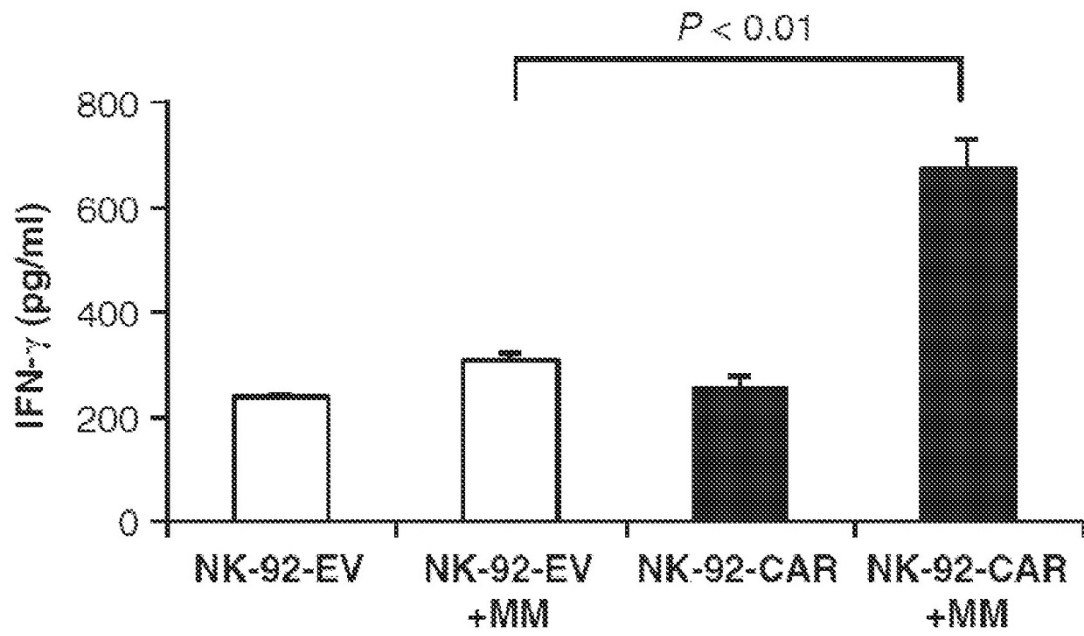


Figure 18C

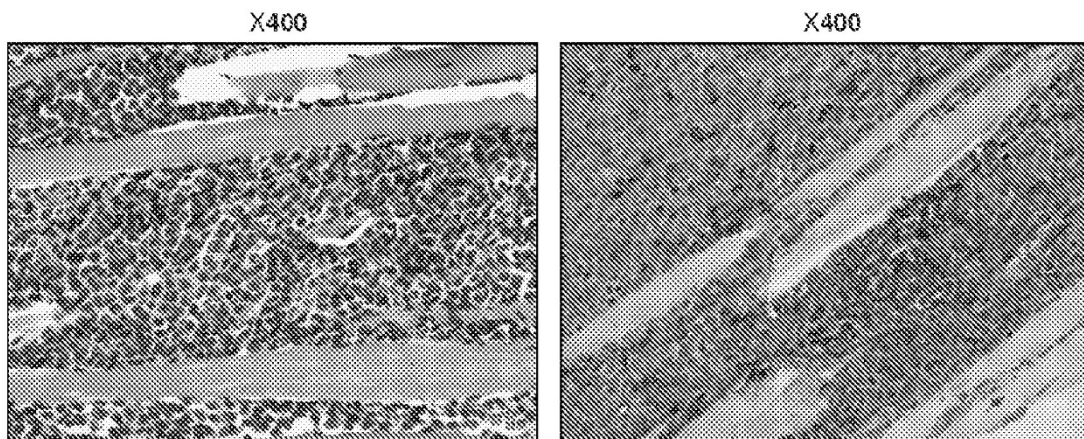


Figura 19A

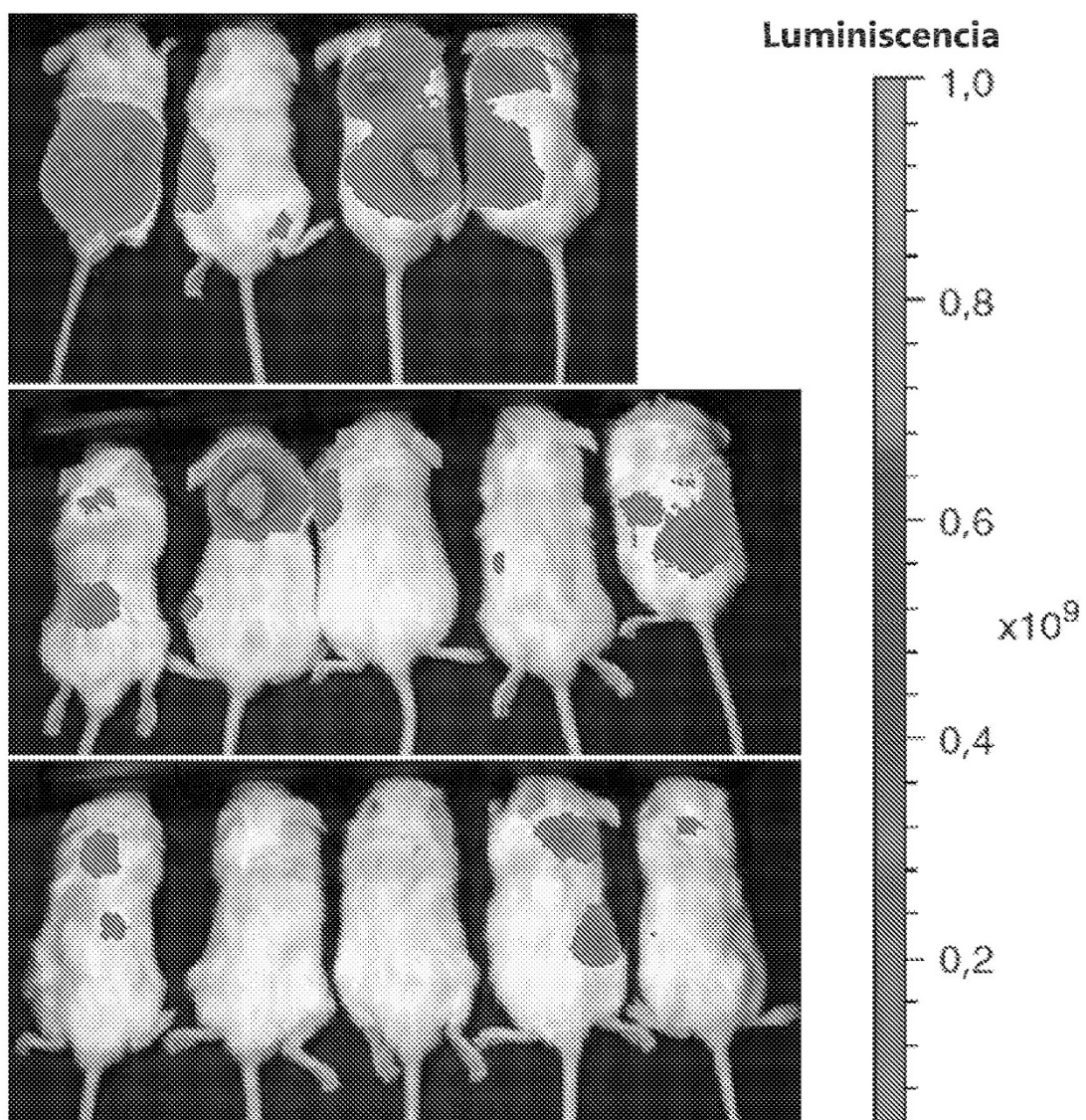


Figura 19B

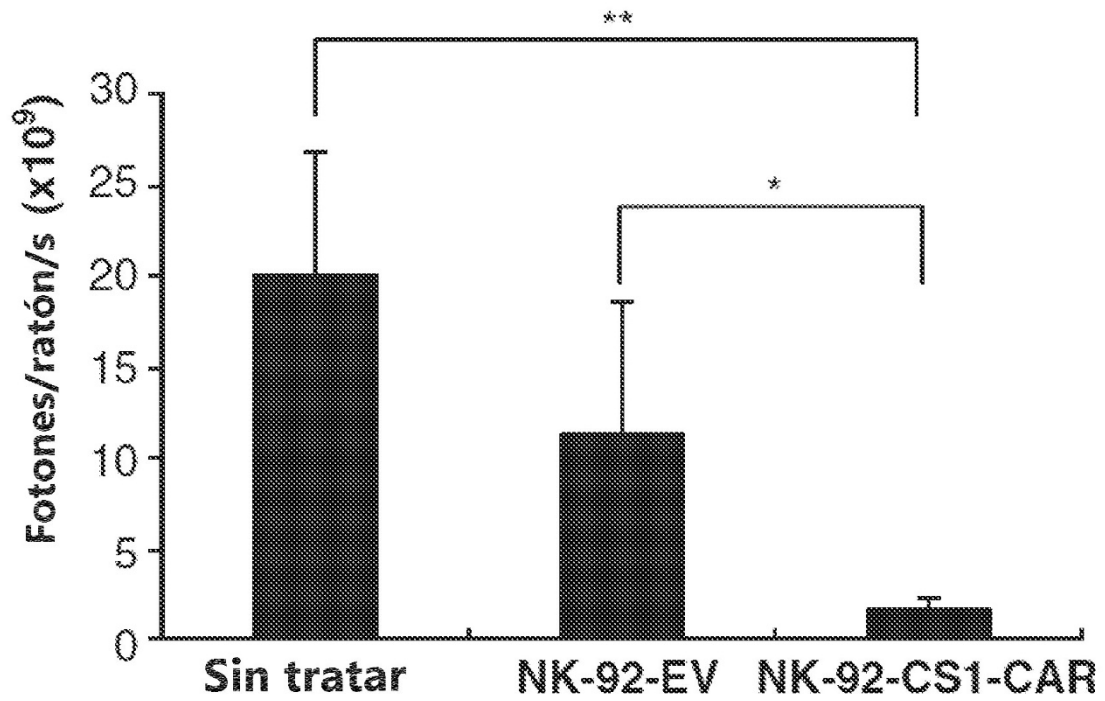


Figura 19C

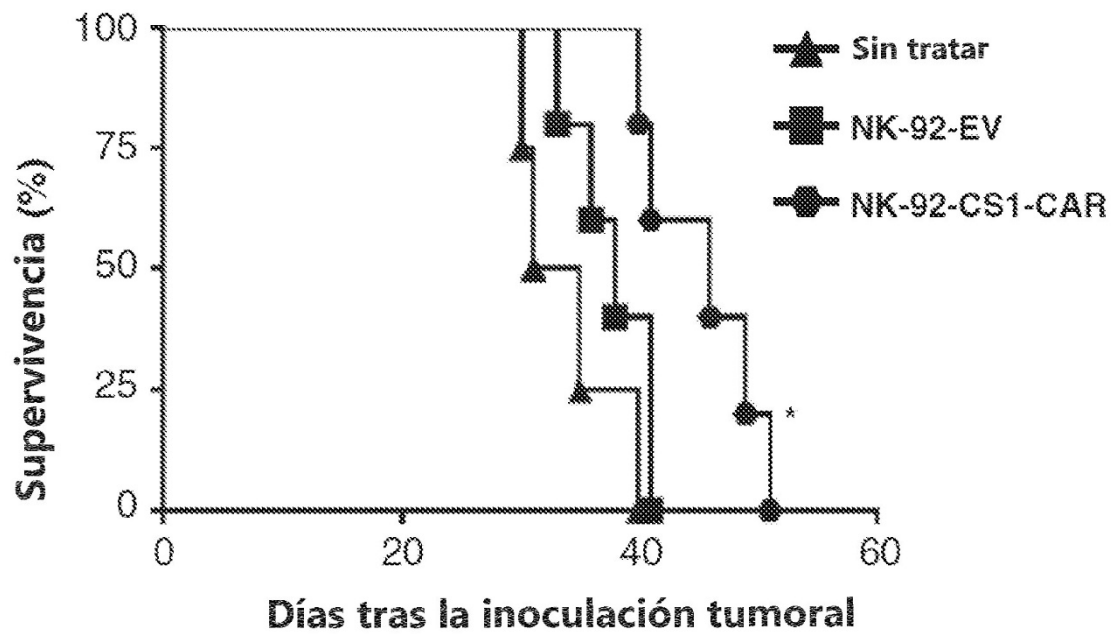


Figura 19D

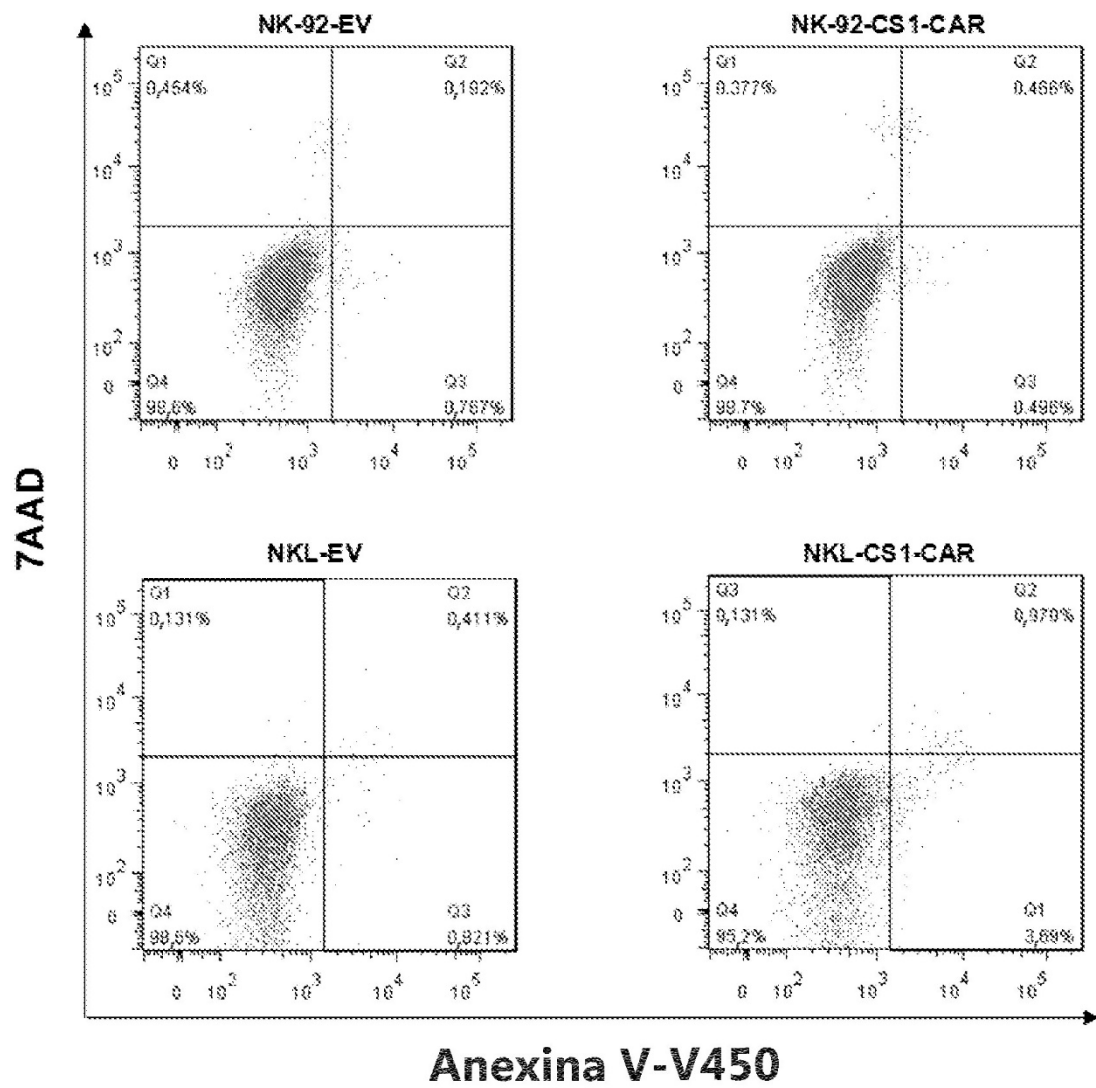


Figura 20