

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad a la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 62/980,914, presentada el 24 de febrero de 2020; la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 63/020,713, presentada el 6 de mayo de 2020; la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 63/053,409, presentada el 17 de julio de 2020; y la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 63/092,681, presentada el 16 de octubre de 2020, cuyos contenidos se incorporan por la presente como referencia en su totalidad.

LISTADO DE SECUENCIAS

15 La presente solicitud contiene un listado de secuencias que se presentó electrónicamente en formato ASCII y se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 2 de febrero de 2021, se denomina AT-034-05_SL.txt y tiene un tamaño de 308 283 bytes.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

20 La presente descripción se refiere a las células T con CAR, especialmente las células T con CAR específico a BCMA con actividades mejoradas, y los métodos de fabricación y los usos de estas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

25 La transferencia adoptiva de células inmunitarias (por ejemplo, las células T) modificadas genéticamente para reconocer los antígenos asociados a neoplasias malignas se muestra prometedora como un nuevo enfoque para tratar el cáncer. Por ejemplo, las células T pueden modificarse genéticamente para expresar receptores quiméricos de antígenos (CAR), que son proteínas de fusión compuestas por un resto de reconocimiento a antígenos y dominios de activación de células T.

30 Una célula T con CAR que sería útil es aquella que reconozca el antígeno de maduración de células B (BCMA, CD269 o TNFRSF17). El BCMA es un miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) y participa en la señalización a favor de la supervivencia. Se identificó el BCMA en un linfoma maligno de células T humanas que contenía una translocación t (4;16). El BCMA se expresa en niveles elevados en células plasmáticas normales y malignas en todas las etapas del mieloma múltiple (MM) y algunas otras neoplasias malignas de células plasmáticas (por ejemplo, el linfoma difuso de células B grandes, DLBCL). El BCMA también se expresa en la mayoría o en todas las células de mieloma, y la expresión está ausente en los linajes de células distintas de B. Los CAR de BCMA ilustrativos se describen en la patente de los Estados Unidos núm. 35 10,294,304, cuya totalidad se incorpora como referencia en la presente descripción. Las células T con CAR de BCMA pueden ser útiles en el tratamiento de una variedad de enfermedades, que incluye el mieloma múltiple (MM), una neoplasia maligna caracterizada

por una acumulación de células plasmáticas clonales. El MM sigue siendo en gran parte incurable y la mayoría de los sujetos desarrollan resistencia con el tiempo.

- La proliferación de células T, la potencia citotóxica y la persistencia se controlan por vías de transducción de señales. Los diseños de CAR convencionales proporcionan dos
- 5 señales: la activación de CD3zeta (señal 1) y la coestimulación (señal 2, por ejemplo, a través de la expresión de 4-1BB, OX40 y/o CD28). En algunos contextos, puede ser conveniente una tercera señal (señal 3), la señalización del receptor de citocina inducida por citocinas (por ejemplo, apoyo de citocinas para la potenciación inmunitaria). Sin embargo, los enfoques para proporcionar la señal 3 se han encontrado con limitaciones significativas.
- 10 En general, un enfoque para proporcionar el apoyo de citocinas incluye combinar la terapia con células T con CAR con infusiones sistémicas de miméticos de citocinas/citocinas recombinantes y modificar por ingeniería genética las células T con CAR para secretar/expresar citocinas extracelularmente. Como las citocinas tienen efectos pleiotrópicos y también pueden afectar la función de otros tipos de células, la administración
- 15 sistémica o la producción de citocinas potenciadoras del sistema inmunológico por las células T con CAR tienen al menos dos inconvenientes principales: (i) estos enfoques pueden provocar toxicidad sistémica en humanos, y (ii) en el contexto de la terapia con células T con CAR alogénicas, estos enfoques pueden provocar una activación inmunitaria del huésped espectador que podría acelerar el rechazo de las células T con CAR alogénicas,
- 20 lo que compromete de este modo la eficacia terapéutica. Otro enfoque para proporcionar el apoyo de citocinas se basó en la introducción de un receptor de citocinas dimerizado constitutivamente activado, un IL-7Ra; esto limita la naturaleza (solo la señalización de IL-7) y la magnitud de la salida de señalización. Otro enfoque más para proporcionar el apoyo de citocinas implicó incorporar la señal 3 directamente en la molécula CAR (Nat Med. 2018 Mar;
- 25 24(3):352-359.). Una limitación de este enfoque es que la fuerza de la señal 3 depende de la fuerza de la activación de CAR. En ausencia de objetivo (y activación de CAR), la señal 3 no se transduciría.

- Se necesitan soluciones para sortear estos inconvenientes al dirigir las señales de citocinas específicamente a las células T con CAR de BCMA de una manera ajustable, lo
- 30 que permite de este modo un perfil de seguridad y eficacia terapéutica mejorados.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

- La presente descripción proporciona las células inmunitarias con CAR de BCMA, tales como las células T con CAR de BCMA, que contienen receptores quiméricos de citocinas constitutivamente activos (CACCR). Cuando están presentes en las células inmunitarias que
- 35 tienen el receptor quimérico de antígeno (CAR) de BCMA (células T con CAR, por ejemplo, células T con CAR de BCMA), tales CACCR permiten una mayor activación, proliferación, persistencia y/o potencia de las células inmunitarias. Las actividades mejoradas de las células T con CAR de BCMA dependen de la presencia del BCMA objetivo. También se proporcionan los métodos para fabricar y usar los CACCR descritos en la presente

descripción en las células inmunitarias con CAR de BCMA, tales como las células T con CAR de BCMA.

Por consiguiente, en un aspecto, en la presente descripción se proporciona una célula I con CAR de BCMA, por ejemplo, una célula T con CAR de BCMA que contiene un

5 CACCR compuesto de dos monómeros, comprendiendo cada monómero: (a) un dominio transmembrana; (b) un dominio de unión a quinasa de Janus (JAK); y (c) un dominio de reclutamiento, en donde los monómeros están dimerizados constitutivamente.

En algunas modalidades, el dominio transmembrana y/o el dominio de unión a JAK de CACCR se derivan del receptor TPOR/MPLR. En algunas modalidades, el dominio

10 transmembrana y/o el dominio de unión a JAK se deriva de los aminoácidos 478 – 582 del receptor TPOR/MPLR de origen natural de la SEQ ID NO: 6. En algunas modalidades, el receptor TPOR/MPLR comprende una o más de las sustituciones de aminoácidos que se seleccionan de H499L, S505N, W515K y G509N. En algunas modalidades, el receptor TPOR/MPLR comprende las sustituciones H499L, S505N y W515K, o las sustituciones

15 S505N y W515K.

En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento es un dominio de reclutamiento de STAT. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento comprende el dominio de reclutamiento de STAT de IL7Ra, por ejemplo, IL7Ra(316-459). En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento comprende el dominio de reclutamiento de STAT

20 de IL2Rb, por ejemplo, IL2Rb (333-551), IL2Rb(393-433, 518-551), IL2Rb(339-379, 393-433, 518-551), IL2Rb(333-551, Y381S, Y384S, Y387S), o IL2Rb(333-551, Y364S, Y381S, Y384S, Y387S). En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento comprende el dominio de reclutamiento de STAT de IL12Rb1, por ejemplo, IL12Rb1(622-662). En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento comprende el dominio de reclutamiento de STAT

25 de IL12Rb2, por ejemplo, IL12Rb2(714-862) o IL12Rb2(775-825). En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento comprende el dominio de reclutamiento de STAT de IL21R, por ejemplo, IL21R(322-538).

En un aspecto relacionado que se proporciona en la presente descripción hay un polinucleótido que codifica cualquiera de los CACCR de la descripción y un vector de

30 expresión que comprende dicho polinucleótido. En algunas modalidades, el polinucleótido codifica además un receptor quimérico de antígeno (CAR), en donde el CAR se une a BCMA (un “CAR de BCMA” o un “CAR específico a BCMA”) (por ejemplo, BCMA humano, número de acceso Uniprot: Q02223-2).

En otro aspecto, en la presente descripción se proporciona una célula inmunitaria

35 modificada por ingeniería genética que comprende al menos un receptor quimérico de antígeno de BCMA y al menos un CACCR de la descripción. En algunas modalidades, la célula inmunitaria es un célula T. En algunas modalidades, la célula inmunitaria es una célula inmunitaria alogénica. En otras modalidades, la célula inmunitaria es una célula inmunitaria autóloga. La célula inmunitaria puede seleccionarse del grupo que consiste en: célula T,

célula dendrítica, célula dendrítica asesina, mastocito, célula NK, macrófago, monocito, célula B y una célula inmunitaria derivada de una célula madre. En un aspecto relacionado, en la presente descripción se proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de las células inmunitarias modificadas por ingeniería genética de la descripción, y un kit que comprende dicha composición farmacéutica. En un aspecto relacionado, la célula inmunitaria modificada por ingeniería genética comprende uno o más polinucleótidos que codifican un CAR de BCMA y un CACCR de la descripción. En un aspecto relacionado, la célula inmunitaria modificada por ingeniería genética comprende un polinucleótido bicistrónico o multicistrónico que codifica un CAR de BCMA y uno o más de un CACCR de la descripción.

En otro aspecto, en la presente descripción se proporciona un método para tratar un cáncer en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las células inmunitarias modificadas por ingeniería genética descritas en la presente descripción.

En otro aspecto, se proporciona un método para fabricar una célula inmunitaria modificada por ingeniería genética que comprende proporcionar una célula, por ejemplo, una célula inmunitaria, una célula T, célula dendrítica, célula dendrítica asesina, mastocito, célula NK, macrófago, monocito, célula B y una célula inmunitaria derivada de una célula madre, e introducir en la célula al menos un polinucleótido que codifica un CAR de BCMA y al menos un polinucleótido que codifica un CACCR de la descripción. En algunas modalidades, la célula se introduce con una o más moléculas de polinucleótidos que codifican un CAR de BCMA y un CACCR. En algunas modalidades, un primer vector comprende un polinucleótido de CAR de BCMA y un segundo vector comprende un polinucleótido de CACCR. En algunas modalidades, un vector comprende tanto un polinucleótido de CAR de BCMA como un polinucleótido de CACCR. En algunas modalidades, el vector es un vector viral, tal como un vector lentiviral. En algunas modalidades, la célula es una célula autóloga, lo que puede significar que se deriva de la misma persona que se tratará con la célula inmunitaria modificada por ingeniería genética preparada a partir de esa célula. En otras modalidades, la célula es una célula alogénica, lo que puede significar que se deriva de una persona distinta de la persona que se tratará con la célula inmunitaria modificada por ingeniería genética, por ejemplo, de un donante sano. En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada por ingeniería genética alogénica comprende además una o más modificaciones genéticas en el locus de la constante alfa de TCR (TRAC) para reducir o anular la expresión del receptor alfa de TCR endógeno. En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada por ingeniería genética comprende además una o más modificaciones genéticas en el gen CD52 para reducir o anular la expresión de CD52. En diversas modalidades, el polinucleótido de CAR de BCMA y/o el polinucleótido de CACCR, y cualquier vector que pueda comprender uno o ambos polinucleótidos, se controlan por el promotor de EF1 alfa. En algunas modalidades, al menos

uno del polinucleótido de CAR de BCMA, el polinucleótido de CACCR y el vector o los vectores que comprenden uno o ambos polinucleótidos codifica además al menos un marcador seleccionable que facilita y/o permite la identificación de las células que contienen el polinucleótido de CAR de BCMA y/o el polinucleótido de CACCR. En diversas

5 modalidades, el polinucleótido de CAR de BCMA y/o el polinucleótido de CACCR, y cualquier vector que pueda comprender uno o ambos polinucleótidos, comprende además un WPRE de tipo salvaje o mutante. En algunas modalidades, el vector comprende además un WPRE mutante. En varias modalidades, el polinucleótido de CAR de BCMA y/o el polinucleótido de CACCR, y cualquier vector que pueda comprender uno o ambos

10 polinucleótidos, pueden introducirse en la célula mediante los métodos conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, varios métodos de electroporación, transfección y transducción viral. En algunas modalidades, un paciente que necesita tratamiento con la célula modificada por ingeniería genética es una persona que tiene una enfermedad o afección que puede tratarse con la célula modificada por ingeniería genética o que podría

15 beneficiarse del tratamiento con la célula modificada por ingeniería genética. En algunas modalidades, la afección es el mieloma múltiple. En algunas modalidades, la enfermedad o la afección es el mieloma múltiple en recaída/resistente al tratamiento. En algunas modalidades, la enfermedad es el mieloma múltiple en recaída. En algunas modalidades, la enfermedad es una neoplasia maligna de células plasmáticas, por ejemplo, el linfoma difuso

20 de células B grandes (DLBCL). En determinadas modalidades, al paciente que ha recibido las células inmunitarias modificadas por ingeniería genética se le administra una cantidad eficaz de rituximab o dasatinib para reducir o eliminar las células inmunitarias modificadas por ingeniería genética.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25 La **Figura 1** muestra un esquema de un CACCR modificado por ingeniería genética ilustrativo de la descripción.

La **Figura 2A** muestra las representaciones esquemáticas de los dominios de reclutamiento ilustrativos del CACCR de la descripción, que comprenden una o más subregiones polipeptídicas de dominio intracelular de IL2Rb. Las **Figura 2B, Figura 2C y**

30 **Figura 2D** muestran los esquemas de vectores ilustrativos que pueden usarse para coexpresar determinadas combinaciones de un CACCR y CAR de BCMA de la descripción. La Figura 2B y la Figura 2C cada uno muestra un vector que expresa a partir de un promotor una secuencia señal CD8, un CACCR, un péptido P2A, una secuencia señal CD8 y un CAR de BCMA, con o sin un WPRE mutante (Elemento regulador postranscripcional del virus de

35 la hepatitis de la marmota), el CACCR representado comprende TpoR(478-582; H499L; S505N; W515K) e IL2Rb (339-379,393-433,518-551). El esquema muestra un CAR de BCMA que contiene el scFv del clon P5A2, con dos copias de mimotopos de rituximab (R2), 41BB y CD3 zeta. La Figura 2D muestra un vector que expresa a partir de un promotor una secuencia señal CD8, un CACCR, un péptido P2A, una secuencia señal CD8, un CAR de

BCMA y un WPRE mutante, el CACCR que comprende TpoR(478-582; H499L; S505N; W515K) e IL2Rb (393-433,518-551).

La **Figura 3A, Figura 3B y Figura 3C** muestran que las células T con CAR y CACCR que tienen colas citoplasmáticas de IL2Rb truncadas imitan más de cerca la señalización de IL-15, en lugar de IL-2.

La **Figura 4** muestra que los CACCR mejoraron la actividad citotóxica de las células T con CAR TRAC/CD52 dKO dirigidas hacia un BCMA objetivo de tumor líquido.

La **Figura 5A, Figura 5B, Figura 5C, Figura 5D y Figura 5E** muestran que los CACCR mejoraron la actividad antitumoral *in vivo* a corto y largo plazo y la persistencia de las células T con CAR de BCMA contra el mieloma múltiple ortotópico.

La **Figura 6A, Figura 6B, Figura 6C, Figura 6D y Figura 6E** muestran la potencia de las células T con CAR de BCMA y CACCR TRAC/CD52 dKO en líneas celulares objetivo que expresan BCMA *in vitro*.

La **Figura 7A y Figura 7B** muestran la potencia de las células T con CAR de BCMA y CACCR TRAC/CD52 dKO *in vivo*.

La **Figura 8A, Figura 8B y Figura 8C** muestran las actividades antitumorales de dos células T con CAR de BCMA y CACCR derivadas de IL2Rb en relación con las células T con CAR de BCMA sin modificar a una dosis de 1×10^6 o 3×10^6 .

La **Figura 9A, Figura 9B y Figura 9C** muestran el porcentaje de CAR+ y el rendimiento de las células T que tienen CAR de BCMA y CACCR en comparación con CAR de BCMA sin modificar, ambas transducidas a células T en un constructo lentiviral.

La **Figura 10A, Figura 10B, Figura 10C, Figura 10D y Figura 10E** muestran los resultados del análisis de la capacidad de fabricación y la función de las células T con CAR de BCMA y CACCR que tienen el WPRE de tipo salvaje o mutante. La **Figura 10F** muestra los resultados similares en las células T con CAR derivadas de PBMC.

La **Figura 11A, Figura 11B, Figura 11C, Figura 11D, Figura 11E, Figura 11F, Figura 11G y Figura 11H** muestran los resultados del análisis de cualquier efecto de la eliminación de WPRE de los constructos lentivirales.

La **Figura 12A, Figura 12B, Figura 12C y Figura 12D** muestran los resultados del análisis de los efectos de los promotores EF1a corto y EF1a de longitud completa.

La **Figura 13A, Figura 13B, Figura 13C, Figura 13D, Figura 13E, Figura 13F y Figura 13G** muestran los resultados del análisis de los efectos de los promotores MND y EF1a de longitud completa. Los datos de T con CAR de BCMA controlado por el promotor de EF1a sin un CACCR (círculo abierto) se superpusieron con los datos de T con CAR de BCMA controlado por el promotor MND y CACCR (cuadrado relleno) (Figura 13F).

La **Figura 14** muestra el perfil de proliferación de las células T con CAR de BCMA y CACCR tras la exposición repetida al objetivo en comparación con las células T con CAR de BCMA sin modificar.

La **Figura 15A y Figura 15B** muestran la sensibilidad de las células T con CAR a la muerte celular inducida por activación (AICD) con una exposición creciente a las células objetivo: mWPRES, WPRES mutante; restim, reestimulación.

La **Figura 16A y Figura 16B** muestran los perfiles de expresión de citocinas de las células T con CAR basados en la tinción de citocinas intracelulares del día 7 del ensayo.

La **Figura 17** muestra el fenotipo de memoria de las células T con CAR el día 15 del ensayo.

La **Figura 18A y Figura 18B** muestran la expansión y la persistencia de las células T con CAR de BCMA en ratones con Molp8-Luc-GFP que habían recibido 5×10^6 células T con CAR.

La **Figura 19A y Figura 19B** muestran la supervivencia general de los ratones que habían recibido 1×10^6 o 5×10^6 células T con CAR hasta el día 60 (Figura 19A) y después del día 100 (Figura 19B).

La **Figura 20** muestra la carga tumoral de ratones individuales que habían recibido 5×10^6 células T con CAR como se muestra en la Figura 19.

La **Figura 21A** representa los datos que muestran la citotoxicidad dependiente del objetivo de las células T con CAR de BCMA y CACCR y las células T con CAR de BCMA sin modificar. La **Figura 21B** representa los datos que muestran los perfiles de secreción de citocinas dependiente del objetivo de las células T con CAR de BCMA y CACCR y las células T con CAR de BCMA sin modificar.

La **Figura 22A y Figura 22B** muestran la falta de expansión de las células T con CAR de BCMA y CACCR en ausencia de la citocina IL-15 objetivo o exógena (Figura 22A) o IL-2 (Figura 22B). La **Figura 22C** muestra los resultados de la tinción con Ki-67 del cultivo de células T con CAR en ausencia del objetivo, mientras que la **Figura 22D** muestra que las células T con CAR fueron capaces de expandirse en presencia de las células objetivo irradiadas (Objetivo i) e IL2. Los datos presentados son la media $\pm$ DE de tres donantes.

La **Figura 23A** muestra los perfiles de expansión de las células T con CAR de BCMA recientemente activadas que se estimularon continuamente con células objetivo, o se les retiraron los objetivos. La **Figura 23B, Figura 23C y Figura 23D** representan los datos que demuestran que las células T con CAR de BCMA y CACCR no pueden persistir a largo plazo *in vivo* en ausencia del objetivo y no ejercen efectos negativos en los ratones sin tumores. La **Figura 23E y Figura 23F** muestran los resultados que demuestran que la expansión *in vivo* de las células T con CAR de BCMA y CACCR fue dependiente del objetivo, y que volvieron a la inactividad después de la eliminación del objetivo. La ganancia de peso de los ratones que recibieron las células T con CAR de BCMA o CAR de BCMA y CACCR fue comparable (**Figura 23G**).

La **Figura 24A, Figura 24B, Figura 24C y Figura 24D** muestran los resultados del ensayo de reducción mediado por rituximab de las células T con CAR de BCMA o CAR de BCMA y CACCR *in vitro* (Figura 24A y Figura 24B) o *in vivo* (Figura 24C y Figura 24D).

La **Figura 25A y Figura 25B** muestran los efectos del inhibidor de la tirosina quinasa dasatinib sobre las actividades de las células T con CAR de BCMA.

La **Figura 26A, Figura 23B y Figura 26C** muestran que la expansión activa de las células T con CAR de BCMA y CACCR fue dependiente del objetivo.

- 5 La **Figura 27A, Figura 27B, Figura 27C y Figura 27D** muestran que el CACCR mejoró la eficacia antitumoral y la expansión de las células T con CAR de BCMA en un modelo ortotópico de mieloma múltiple.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

- La presente descripción proporciona la combinación de un CAR de BCMA y los receptores quiméricos de citocinas constitutivamente activos (CACCR). Los CAR de BCMA y los CACCR descritos en la presente descripción son polipéptidos que cada uno comprende dominios de diferentes proteínas y secuencias de aminoácidos, como se detalla adicionalmente en la presente descripción. La presencia de un receptor quimérico de citocina ajustable, constitutivamente activo, permite la potenciación inmunitaria de la señal
- 10 3 para satisfacer la necesidad de la potenciación inmunitaria. Por consiguiente, cuando están presentes en las células inmunitarias que tienen el receptor quimérico de antígeno (CAR) de BCMA (células I con CAR, por ejemplo, células T con CAR) como se describe en la presente descripción, tales CACCR permiten una mayor activación, proliferación, persistencia y/o potencia de las células inmunitarias. También se proporcionan en la
- 15 20 presente descripción los métodos para fabricar y usar los CACCR descritos en la presente descripción en combinación con los CAR específicos a BCMA.

- Los CACCR para uso como se describen en la presente descripción son ajustables y tienen salidas de señalización de citocinas flexibles para la mejora de la actividad, persistencia de las células T con CAR de BCMA y similares. Los componentes, los métodos
- 25 de fabricación y el uso se describen a continuación.

I. Receptores quiméricos de citocinas constitutivamente activos (CACCR)

- Los CACCR de la descripción están compuestos por dos monómeros, cada uno de los cuales comprende: (a) un dominio transmembrana; (b) un dominio de unión a JAK; y (c) un dominio de reclutamiento, en donde los monómeros están dimerizados constitutivamente.
- 30 En algunas modalidades, el CACCR de la descripción no comprende un dominio de unión a ligando extracelular.

- En algunas modalidades, los monómeros son idénticos, lo que da lugar a un homodímero constitutivamente activo. En tales modalidades, se reduce el número de proteínas que necesitan expresarse en un vector. En algunas modalidades, los monómeros
- 35 no son idénticos, lo que da lugar a un heterodímero constitutivamente activo, que puede ser conveniente en determinadas circunstancias.

Los monómeros de los CACCR de la descripción son capaces de dimerizarse espontáneamente y pueden activar la señalización en ausencia de cualquier estimulación o ligando exógeno (dimerización independiente de ligando). El nivel de actividad puede

controlarse mediante mutaciones introducidas en el dominio transmembrana de los CACCR. Un experto en la técnica apreciará que los monómeros de los CACCR no están dimerizados el 100 % del tiempo y pueden existir como monómeros.

A. Dominios transmembrana

5 Los CACCR de la descripción comprenden los dominios transmembrana. Los dominios transmembrana de la descripción contienen secuencias tales que permiten la dimerización constitutiva de dos monómeros, lo que permite la activación constitutiva de JAK en la porción intracelular y el reclutamiento y la fosforilación constitutivos de, por ejemplo, STAT en la región citoplasmática del receptor.

10 Los dominios transmembrana están en el N-terminal y están acoplados a dominios intracelulares/citoplasmáticos en el C-terminal. En algunas modalidades, el acoplamiento se logra opcionalmente a través de un enlazador.

Como se usa en la presente descripción, los dominios transmembrana son capaces de insertarse en la membrana de una célula en la que se expresa. En algunas modalidades, **15** los dominios transmembrana de CACCR de la descripción abarcan una membrana celular y comprenden una porción extracelular y/o una porción intracelular. En algunas modalidades, los dominios transmembrana de CACCR de la descripción abarcan una membrana celular, comprenden una porción intracelular y no comprenden una porción de unión a ligando extracelular.

20 En algunas modalidades, los dominios transmembrana de la descripción se modifican por ingeniería genética (sintéticos) y no se parecen a ningún dominio transmembrana de origen natural, por ejemplo, no son de origen natural.

En otras modalidades, los dominios transmembrana de la descripción se derivan de receptores de origen natural.

25 En algunas modalidades, los dominios transmembrana y/o los dominios activadores de JAK de la descripción se derivan de, por ejemplo, uno o más de los siguientes receptores: receptor de eritropoyetina (EpoR), transductor de señal de interleucina 6 (GP130 o IL6ST), receptor de prolactina (PrlR), receptor de la hormona del crecimiento (GHR), receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSFR) y receptor de **30** trombopoyetina/receptor de proteína de leucemia mieloproliferativa (TPOR/MPLR). Cuando se deriva de receptores de origen natural, el receptor completo o la secuencia transmembrana completa del receptor puede no ser necesario para efectuar la activación constitutiva y la unión/activación constitutiva de JAK en la porción intracelular. Por consiguiente, pueden usarse fragmentos de receptores de origen natural. Además, pueden **35** introducirse determinadas mutaciones en los dominios transmembrana derivados de receptores de origen natural, para sintonizar aún más la señalización descendente.

En algunas modalidades, el dominio transmembrana y/o el dominio activador de JAK de la descripción se derivan del receptor EpoR de origen natural.

En algunas modalidades, el dominio transmembrana y/o el dominio activador de JAK de la descripción se derivan del receptor GP130 de origen natural.

En algunas modalidades, el dominio transmembrana y/o el dominio activador de JAK de la descripción se derivan del receptor PrIR de origen natural.

5 En algunas modalidades, el dominio transmembrana y/o el dominio activador de JAK de la descripción se derivan del receptor GHR de origen natural.

En algunas modalidades, el dominio transmembrana y/o el dominio activador de JAK de la descripción se derivan del receptor de GCSF de origen natural.

10 En algunas modalidades, el dominio transmembrana y/o el dominio activador de JAK de la descripción se derivan del receptor TPOR de origen natural.

La Tabla 1a proporciona las secuencias de longitud completa ilustrativas de los receptores de origen natural proporcionados en la descripción, de los cuales se derivan las proteínas transmembrana. Las secuencias proporcionadas en la Tabla 1a son secuencias de referencia, en relación con las cuales se expresan las mutaciones posteriores, por ejemplo, en las Tablas 1b y 1c.

15

Tabla 1a: Receptores ilustrativos de origen natural

Nombre del receptor de origen natural	SEQ ID NO:
20 >AAI12154.1 Receptor de eritropoyetina [<i>Homo sapiens</i>] MDHLGASLWPQVGSCLLLAGAAWAPPPNLPDPKFESKAALLAARGPEELL CFTERLEDLVCFWEEAASAGVGPGNYSFSYQLEDEPWKLCRLHQAPTARG AVRFWCSLPTADTSSSFVPLELRVTAASGAPRYHRVIHINEVVLLDAPVGLVAR LADESGHVVLRLWLPPEPMTSHIRYEVDVSAGNGAGSVQRVEILEGRTEC 25 VLSNLRGRTRYTFAVRARMAEPSFGGFWSAWSEPVSLTPSDLDPLILTLCLI LVVILVLLTVLALLSHRRALKQKIWPGIPSESEFEGLFTTHKGNFQLWLYQND GCLWWSPCTPFTEDPPASLEVLSERCWGTMQAVEPGTDDEGPLLEPVGSE HAQDTYLVLDKWLLPRNPPSEDLPGPGGSDIVAMDEGSEASSCSSALASK PSPEGASAASFYETILDPSSQLLRPWTLCPPELPTPPHLKYLYLVVSDSGIST 30 DYSSGDSQGAQGGLSDGPYSNPYENSLIPAAEPLPPSYVACS	1

35

Nombre del receptor de origen natural	SEQ ID NO:
5 >AAI17403.1 Transductor de señal de interleucina 6 (GP130, receptor de oncostatina M) [<i>Homo sapiens</i>] MLTLQTWLVQALFIFLTTESTGELLDPGCGYISPESPVVQLHSNFTAVCVLKEK CMDYFHVNANYIVWKTNHFTIPKEQYTIINRTASSVTFTDIASLNIQLTCNILTF GQLEQNVYGITIISGLPPEKPKNLSCIVNEGKKMRCEWDRGRETHLETNFTLK SEWATHKFADCKAKRDTPTSCTVDYSTVYFVNIEVWVEAENALGKVTSDHIN FDPVYKVKPNPPHNLSVINSEELSSILKLTWTNPSIKSVIILKYNIQYRTKDAST 10 WSQIPPEDTASTRSSFTVQDLKPFTEYVFRIRCMKEDGKGYWSDWSEEASG ITYEDRPSKAPSFYWKIDPSHTQGYRTVQLVWKTLPPEANGKILDYEVTLTR WKSHLQNYTVNATKLTVNLTNDRYVATLTVRNLVGKSDAAVLTIPACDFQAT HPVMDLKAFPKDNMLWVEWTPRESVKKYILEWCVLSDKAPCITDWQQEDG TVHRTYLRGNLAESKCYLITVTPVYADGPGSPESIKAYLKQAPPSKGPTVVRTK 15 KVGKNEAVLEWDQLPVDVQNGFIRNYTIFYRTIIGNETAVNVDSSHTEYTLSS LTSDTLYMVRMAAYTDEGGKDGPEFTFTTPKFAQGEIEAIVVPVCLAFLLTTL LGVLFCCFNKRDLIKHIWPNVPDPSKSHIAQWSPHTPPRHNFNSKDQMYSD GNFTDVSVEIEANDKKPFPEDLKSLDLFKKEKINTEGHSSGIGGSSCMSSSR PSISSSDENESSQNTSSTVQYSTVHSGYRHQVPSVQVFSRSESTQPLLDSE 20 ERPEDLQLVDHVDGGDGILPRQQYFKQNCSEQHESSPDISHFERSKQVSSVN EEDFVRLKQQISDHISQSCGSGQMFMFQEVSAADAFGPGTEGQVERFETVG MEAATDEGMPKSYLPQTVRQGGYMPQ	2
25 >XP_011512371.1 Isoforma X2 del receptor de prolactina [<i>Homo sapiens</i>] MKENVASATVFTLLLFLNTCLLNGQLPPGKPEIFKCRSPNKETFTCWWRPGT DGGLPTNYSPTYHREGETLMHECPDYITGGPNSCHFQKQYTSMWRTYIMMV NATNQMGSFSDELVDVTYIVQDPPELAVEVKQPEDRKPYLWIKWSPPT LIDLKTGWFTLLYEIRLKPEKAAEWEIHFAGQQTEFKILSLHPGQKYLQVVRCK PDHGYWSAWSPATFIQIPSDFTMNDTTVWISVAVLSAVICLIIVWAVALKGYS MVTICIFPPVPGPKIKGFDALHLEKKGKSEELLSALGCQDFPPTSDYEDLLVEYL 30 EVDDSEDQHLM SVHSKEHPSQGMKPTYLDPDTSGRGSCDSPSLLSEKCE EPQANPSTFYDPEVIEKPENPETHTWDPQCISMEGKIPYFHAGGSKCSTWP LPQPSQHNPRSSYHNITDVCELAVGPAGAPATLLNEAGKDALKSSQTIKSRE EGKATQQREVESFHSETDQDTPWLLPQEKTPFGSAKPLDYVEIHKNKDGA LSLLPKQRENSGKPKPGTPENNKEYAKVSGVMDNNILVLPDPHAKNVACF 35 EESAKEAPPSLEQNQA EKALANFTATSSKCRLQLGGLDYLD PACFTHSFH	3

Nombre del receptor de origen natural	SEQ ID NO:
>NP_000154.1 Precursor de la isoforma 1 del receptor de la hormona del crecimiento [<i>Homo sapiens</i>] 5 MDLWQLLLTLALAGSSDAFSGSEATAAILSRAPWSLQSVNPGLKTNSSKEPK FTKCRSPERETFCHWTDEVHHGTKNLGPIQLFYTRRNTQEWTQEWKECP DYVSAGENSICYFNSSFTSIWIPYCIKLTSSNGGTVDKCFVDEIVQPDPIALN WTLNLSLTGIHADIQVRWEAPRNADIKGWMVLEYELQYKEVNETKWKMM DPILTSVPVYSLKVDKEYEVRVRSKQRNSGNYGEFSEVLYVTLPQMSQFTC 10 EEDFYFPWLLIIIFGIFGLTVMLFVFLFSKQQRKMLILPPVPVPIKIGIDPDLLKE GKLEEVNTILAIHDSYKPEFHSDDSWVEFIELDIDEPEKTEESDTRLLSSDH EKSHSNLGVKDGDSGRTSCCEPDILETDFNANDIHEGTSEVAQPQRLKGEA DLLCLDQKNQNNSPYHDACPATQQPSVIAEKNKPQLPTEGAESTHQAHI QLSNPSSLSNIDFYAQV 15 SDITPAGSVVLSPGQKNKAGMSQCDMHPEMVSLCQENFLMDNAYFCEADA KKCIPVAPHIKVESHIQPSLNQEDIYITTESLTTAAGRPGTGEHVPGSEMPVPD YTSIHIVQSPQGLLNATALPLPDKEFLSSCGYVSTDQLNKIMP	4
>XP_016855859.1 Isoforma X1 del receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos [<i>Homo sapiens</i>] 20 MARLGNCSLTWAALIILLPGSLEECGHISVSAPIVHLGDPITASCIKQNCNHL DPEPQILWRLGAELQPGGRQQRLSDGTQESIITLPHLNHTQAFLSCCLNWGN SLQILDQVELRAGYPPAIPHNLSCLMNLTSSSLICQWEPGPETHLPTSFTLKSF KSRGNCQTQGDSILDCVPKDGQSHCCIPRKHLLLYQNMGIWVQAENALGTS MSPQLCLDPMDVVKLEPPMLRTMDPSPEAAPPQAGCLQLCWEPWQPGLHI 25 NQKCELRHKPQRGEASWALVGPLPLEALQYELCGLLPATAYTLQIRCIRWPL PGHWSDWSPSLELRTTERAPTVRDLTWWRQRQLDPRTVQLFWKVPLEED SGRIQGYVVSWRPSGQAGAILPLCNTTELSTFHLPSAQEVALVAYNSAGT SRPTPVVFSESRRPALTRLHAMARDPHSLWVGWEPNPWPQGYVIEWWGLG PPSASNSNKTWRMEQNGRATGFLLENIRPFQLYEIIIVTPLYQDTMGPSQHV 30 YAYSQEMAPSHAPELHLKHIGKTWAQLEWVPEPPELGKSPLTHYTIFWTNAQ NQSFSAILNASSRGFVLHGLEPASLYHIHLMAASQAGATNSTVLTMTLTPEG SELHIILGLFGLLLLLTCLCGTAWLCCSPNRKNPLWPSVPDPAHSSLGSWVPT IMEELPGPRQGQWLGGTSEMSRALTPHPCVQDAFQLPGLGTPPITKLTVLEE DEKKPVPWESHNSSETCGLPTLVQTYVLQGDPRVSTQPPSQSGTSDQVL 35 YGQLLGSPTSPGPGHYLRCDSTQPLLAGLTPSPKSYENLWFQASPLGTLVTP APSQEDDCVFGPLLNFLLQGIRVHGMEALGSF	5

Nombre del receptor de origen natural	SEQ ID NO:
>NP_005364.1 Precursor del receptor de trombopoyetina [<i>Homo sapiens</i>] MPSWALFMVTSCLLLAPQNLAQVSSQDVSLASDSEPLKCFSTRFEDLTCTF WDEEEAAPSGTYQLLYAYPREKPRACPLSSQSMPHFGTRYVCQFPDQEEV RLFFPLHLWVKNVFLNQTRTQRVLFVDSVGLPAPPSIIKAMGGSQPGELQIS WEEPAPEISDFLRYELRYGPRDPKNSTGPTVIQLIATETCCPALQRPHSASAL DQSPCAQPTMPWQDGPQTSPSREASALTAEGGSCGISGLQPGNSYWLQL RSEPDGISLGGSWGWSLPTVDLPGDAVALGLQCFTLDLKNVTCQWQQQ DHASSQGFFYHSRARCCPRDRYPIWENCEEEEEKTNPGLQTPQFSRCHFES RNDSEIHLVEVTTAPGTVHSLGSPFWIHQAVRLPTPNLHWREISSGHLELE WQHPSSWAAQETCYQLRYTGEGHQDWKVLPEPLGARGGTLELRPRSRYRL QLRARLNGPTYQGPWSSWSDPTRVETATETAWISLVTALHLVLGLSAVLGLL LLRWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEE VEPSLLEILPKSSERTPLPLCSSQAQMDYRRLQPSCLGTMPLSVCPMAESG SCCTTHIANHSYLPLSYWQQP	6

En algunas modalidades, el dominio transmembrana de la descripción se deriva de una versión truncada del receptor TPOR/MPLR (proteína de leucemia mieloproliferativa) de origen natural mostrado en la Tabla 1a.

En algunas modalidades, el dominio transmembrana del CACCR comprende los aminoácidos 478-582 del receptor TPOR de la Tabla 1a.

La Tabla 1b proporciona las secuencias de aminoácidos ilustrativas del dominio transmembrana de la descripción, en donde el dominio transmembrana se deriva del receptor TPOR de origen natural. En las secuencias enumeradas en la Tabla 1b, la secuencia de aminoácidos transmembrana del receptor TPOR comprende la SEQ ID NO: 7 (“secuencia transmembrana de origen natural”) o difiere de la SEQ ID NO: 7 en que comprende una o más sustituciones de aminoácidos de la SEQ ID. NO: 7 (“secuencia transmembrana modificada”).

Tabla 1b: Secuencias de aminoácidos ilustrativas del dominio transmembrana

Dominio transmembrana	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
TPOR/MPLR(478-582)	SDPTRVETATETAWISLVTALHLVLGLSAVLGLLLLRW QFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPP KATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL	7
TPOR/MPLR(478-582; H499L,S505N)	SDPTRVETATETAWISLVTALLLVLGLNAVLGLLLLRW QFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPP KATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL	8

	Dominio transmembrana	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
5	TPOR/MPLR(478-582;S505N)	SDPTRVETATETAWISLVTALHLVLGL N AVLGLLLLRW QFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPP KATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL	9
	TPOR/MPLR(478-582;H499L,W515K)	SDPTRVETATETAWISLVTAL L VLGLSAVLGLLLL RKQ FPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPK ATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL	10
10	TPOR/MPLR(478-582;W515K)	SDPTRVETATETAWISLVTALHLVLGLSAVLGLLLL RK QFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPP KATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL	11
	TPOR/MPLR(478-582;H499L,S505N,W515K)	SDPTRVETATETAWISLVTAL L VLGL N AVLGLLLL RKQ FPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPK ATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL	12
15	TPOR/MPLR(478-582;S505N,W515K)	SDPTRVETATETAWISLVTALHLVLGL N AVLGLLLL RK QFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPP KATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL	13
	TPOR/MPLR(478-582;H499L,G509N)	SDPTRVETATETAWISLVTAL L VLGLSAVL N LLLLRW QFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPP KATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL	14
20			

En algunas modalidades, el dominio transmembrana del CACCR comprende los aminoácidos 478-582 del receptor TPOR y una sustitución de aminoácidos al menos en H499. En algunas modalidades, el dominio transmembrana del CACCR comprende los aminoácidos 478-582 del receptor TPOR y la sustitución de aminoácidos H499L.

En algunas modalidades, el dominio transmembrana del CACCR comprende los aminoácidos 478-582 del receptor TPOR y una sustitución de aminoácidos al menos en S505. En algunas modalidades, el dominio transmembrana del CACCR comprende los aminoácidos 478-582 del receptor TPOR y la sustitución de aminoácidos S505N.

En algunas modalidades, el dominio transmembrana del CACCR comprende los aminoácidos 478-582 del receptor TPOR y una sustitución de aminoácidos al menos en G509. En algunas modalidades, el dominio transmembrana del CACCR comprende los aminoácidos 478-582 del receptor TPOR y la sustitución de aminoácidos G509N.

En algunas modalidades, el dominio transmembrana del CACCR comprende los aminoácidos 478-582 del receptor TPOR y una sustitución de aminoácidos al menos en W515. En algunas modalidades, el dominio transmembrana del CACCR comprende los aminoácidos 478-582 del receptor TPOR y la sustitución de aminoácidos W515K.

En algunas modalidades, el dominio transmembrana del CACCR comprende los aminoácidos 478-582 del receptor TPOR y una sustitución de aminoácidos en H499 y S505 (secuencia proporcionada en la Tabla 1b).

5 En algunas modalidades, el dominio transmembrana del CACCR comprende los aminoácidos 478-582 del receptor TPOR y una sustitución de aminoácidos en H499 y W515 (secuencia proporcionada en la Tabla 1b).

En algunas modalidades, el dominio transmembrana del CACCR comprende los aminoácidos 478-582 del receptor TPOR y una sustitución de aminoácidos en H499, S505 y W515 (secuencia proporcionada en la Tabla 1b).

10 En algunas modalidades, el dominio transmembrana del CACCR comprende los aminoácidos 478-582 del receptor TPOR y una sustitución de aminoácidos en S505 y W515 (secuencia proporcionada en la Tabla 1b).

15 En algunas modalidades, el dominio transmembrana del CACCR comprende los aminoácidos 478-582 del receptor TPOR y una sustitución de aminoácidos en H499 y G509 (secuencia proporcionada en la Tabla 1b).

En algunas modalidades, el dominio transmembrana del CACCR comprende los aminoácidos 478-582 del receptor TPOR y las sustituciones de aminoácidos H499L y S505N (secuencia proporcionada en la Tabla 1b).

20 En algunas modalidades, el dominio transmembrana del CACCR comprende los aminoácidos 478-582 del receptor TPOR y las sustituciones de aminoácidos H499L y W515K (secuencia proporcionada en la Tabla 1b).

En algunas modalidades, el dominio transmembrana del CACCR comprende los aminoácidos 478-582 del receptor TPOR y las sustituciones de aminoácidos H499L y G509N (secuencia proporcionada en la Tabla 1b).

25 En algunas modalidades, el dominio transmembrana del CACCR comprende los aminoácidos 478-582 del receptor TPOR y las sustituciones de aminoácidos S505N y W515K (secuencia proporcionada en la Tabla 1b).

30 En algunas modalidades, el dominio transmembrana del CACCR comprende los aminoácidos 478-582 del receptor TPOR y las sustituciones de aminoácidos H499L, S505N y W515K (secuencia proporcionada en la Tabla 1b).

En algunas modalidades, el dominio transmembrana del CACCR comprende los aminoácidos 478-582 del receptor TPOR y una sustitución de aminoácidos en H499 y S505 (secuencia proporcionada en la Tabla 1b).

35 Los CACCR de la descripción pueden ajustarse para lograr el nivel de señal 3/potenciación inmunitaria requerida en una célula inmunitaria que tiene CAR de BCMA (por ejemplo, célula T con CAR de BCMA) y deseada en un contexto o condición particular.

En algunas modalidades, se desea un nivel bajo de activación de STAT5 en una célula inmunitaria que tiene CAR de BCMA (por ejemplo, célula T con CAR de BCMA). A modo de ejemplo, en tales modalidades, puede introducirse el dominio transmembrana del

CACCR que comprende los aminoácidos 478-582 del receptor TPOR, y la sustitución de aminoácidos S505N, W515K o H499L/G509N.

- En algunas modalidades, se desea un mayor nivel de activación de STAT5 en una célula inmunitaria que tiene CAR de BCMA (por ejemplo, célula T con CAR de BCMA). A modo de ejemplo, en tales modalidades, puede introducirse el dominio transmembrana del CACCR que comprende los aminoácidos 478-582 del receptor TPOR, y las sustituciones de aminoácidos H499L, S505N y W515K. A modo de otro ejemplo, en tales modalidades, puede introducirse el dominio transmembrana del CACCR que comprende los aminoácidos 478-582 del receptor TPOR, y las sustituciones de aminoácidos S505N y W515K.
- En algunas modalidades, se desea una mayor diferenciación en las células T de memoria en una célula inmunitaria que tiene CAR de BCMA (por ejemplo, célula T con CAR de BCMA). A modo de ejemplo, en tales modalidades, puede introducirse el dominio transmembrana del CACCR que comprende los aminoácidos 478-582 del receptor TPOR, y las sustituciones de aminoácidos W515K o H499L/G509N.
- En algunas modalidades, se desea una mayor diferenciación en las células T de memoria en una célula inmunitaria que tiene CAR de BCMA (por ejemplo, célula T con CAR de BCMA). A modo de ejemplo, en tales modalidades, puede introducirse el dominio transmembrana del CACCR que comprende los aminoácidos 478-582 del receptor TPOR, y las sustituciones de aminoácidos S505N/W515K y H499L/S505N/W515K.
- En la presente descripción también se proporcionan las sustituciones para aumentar la potencia citotóxica, la durabilidad de la respuesta y la persistencia aumentada, por ejemplo, las sustituciones S505N/W515K y H499L/S505N/W515K.

Tabla 1c: Secuencias ilustrativas de dominio de unión a JAK2 + transmembrana

25	Dominio de unión a JAK2 y transmembrana	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
30	GCSFR(614-710)	LTLMTLTPEGSELHIILGLFGLLLLLTCLCGTAWLCCSPNR KNPLWPSVPDPAHSSLGWSVPTIMEEDAFQLPGLGTPPI TKLTVLEEDEKKPVPWE	15
	GP130(609-700)	TTPKFAQGEIEAIVVPVCLAFLLTLLGLVFCFNKRDLIKKH IWPNVDPDSKSHIAQWSPHTPPRHNFNSKDQMYSDGNF TDVSVVEIEAND	16
35	TPOR/MPLR(478-582)	SDPTRVETATETAWISLVTAHLVLGLSAVLGLLLLRWQF PAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATV SDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL	17
	TPOR/MPLR(N-1)	SDPTRVETATETWISLVTAHLVLGLSAVLGLLLLRWQFP AHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATVS DTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL	18

	Dominio de unión a JAK2 y transmembrana	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
5	TPOR/MPLR(N-2)	SDPTRVETATETISLVTALHLVLGLSAVLGLLLLRWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL	19
	TPOR/MPLR(N-2+1)	SDPTRVETATETLISLVTALHLVLGLSAVLGLLLLRWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL	20
10	TPOR/MPLR(N-3)	SDPTRVETATETSLVTALHLVLGLSAVLGLLLLRWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL	21
15	TPOR/MPLR(N-4)	SDPTRVETATETLVTALHLVLGLSAVLGLLLLRWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL	22
	TPOR/MPLR(N-4+1)	SDPTRVETATETILVTALHLVLGLSAVLGLLLLRWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL	23
20	TPOR/MPLR(N-5)	SDPTRVETATETVTALHLVLGLSAVLGLLLLRWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL	24
25	TPOR/MPLR(N-6)	SDPTRVETATETTALHLVLGLSAVLGLLLLRWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL	25
	TPOR/MPLR(N-7)	SDPTRVETATETATLHLVLGLSAVLGLLLLRWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL	26
30	TPOR/MPLR(N-8)	SDPTRVETATETLHLVLGLSAVLGLLLLRWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL	27
	TPOR/MPLR(N-9)	SDPTRVETATETHLVLGLSAVLGLLLLRWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL	28
35	TPOR/MPLR(N-10)	SDPTRVETATETLVGLSAVLGLLLLRWQFPAHYRRLRALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL	29

	Dominio de unión a JAK2 y transmembrana	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
5	TPOR/MPLR(N-11)	SDPTRVETATETVLGLSAVLGLLLLRWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL	30
	TPOR/MPLR(N-12)	SDPTRVETATETLGLSAVLGLLLLRWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL	31
10	TPOR/MPLR(N-13)	SDPTRVETATETGLSAVLGLLLLRWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL	32
	TPOR/MPLR(N-14)	SDPTRVETATETLSAVLGLLLLRWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL	33
15	TPOR/MPLR(N-15)	SDPTRVETATETSAVLGLLLLRWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL	34
	TPOR/MPLR(N-16)	SDPTRVETATETAVALGLLLLRWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL	35
20	TPOR/MPLR(N-17)	SDPTRVETATETVLGLLLLRWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL	36
	TPOR/MPLR(N-18)	SDPTRVETATETLGLLLLLRWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL	37
25	TPOR/MPLR(N-19)	SDPTRVETATETLGLLLLLRWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL	38
	TPOR/MPLR(N-20)	SDPTRVETATETLGLLLLLRWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL	39
30	TPOR/MPLR(N-21)	SDPTRVETATETLGLLLLLRWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL	40
	TPOR/MPLR(N-22)	SDPTRVETATETLGLLLLLRWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL	41
35	TPOR/MPLR(N-23)	SDPTRVETATETLGLLLLLRWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL	42
	TPOR/MPLR(N-24)	SDPTRVETATETLGLLLLLRWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL	43

	Dominio de unión a JAK2 y transmembrana	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
5	TPOR/MPLR(N+4)	SDPTRVETATETAWILVLISLVTALHLVLGLSAVLGLLLLR WQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPP KATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL	41
	TPOR/MPLR(N+5)	SDPTRVETATETAWLILVLISLVTALHLVLGLSAVLGLLLLR WQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPP KATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL	42
10	TPOR/MPLR(N+6)	SDPTRVETATETAWLLILVLISLVTALHLVLGLSAVLGLLLL RWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPP PKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL	43
15	TPOR/MPLR(N+7)	SDPTRVETATETAWVLLILVLISLVTALHLVLGLSAVLGLLL LRWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALS PPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL	44
	TPOR/MPLR(N+8)	SDPTRVETATETAWLVLLILVLISLVTALHLVLGLSAVLGLL LLRWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL	45

20 **B. Dominios de unión a la quinasa de Janus (JAK)**

Los CACCR de la descripción comprenden dominios de unión a JAK intracelulares. El dominio de unión a JAK se acopla al extremo C-terminal del dominio transmembrana, ya sea directamente o mediante un enlazador. El dominio de unión a JAK se acopla al dominio transmembrana en el lado intracelular del receptor quimérico de citocina.

25 En algunas modalidades, el dominio de unión a JAK es un dominio de unión a JAK-1, un dominio de unión a JAK-2, un dominio de unión a JAK-3 o un dominio de unión a TYK2.

En algunas modalidades, los dominios de unión a JAK de los CACCR de la descripción son de origen natural y se derivan de un receptor de origen natural.

30 En algunas modalidades, los dominios de unión a JAK de los CACCR de la descripción son sintéticos.

La Tabla 1b y la Tabla 1c proporcionan las secuencias de aminoácidos ilustrativas para los dominios de unión a JAK2 y transmembrana y de la descripción. En algunas modalidades, el CACCR de la descripción comprende un dominio de unión a JAK2 y transmembrana que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona de las secuencias de las Tablas 1b y 1c. Una secuencia de aminoácidos que comprende tanto un dominio de unión JAK2 como transmembrana es un polipéptido que puede denominarse en la presente descripción como un “polipéptido TM/JAK”. Así, por ejemplo, la Tabla 1c enumera los polipéptidos TM/JAK ilustrativos, tales como TPOR/MPLR(478-582), y de

manera similar, la Tabla 1b enumera las variantes de TPOR/MPLR(478-582) que también son polipéptidos TM/JAK, tales como TPOR/MPLR(478-582;H499L,S505N,W515K) y TPOR/MPLR(478-582;S505N,W515K). En algunas modalidades, el CACCR de la descripción comprende un dominio de unión a JAK2 y transmembrana que comprende una

5 secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a cualquiera de las secuencias de las Tablas 1b y 1c.

C. Dominios de reclutamiento

Los CACCR de la descripción comprenden dominios de reclutamiento citoplasmáticos. El dominio de reclutamiento puede ser un dominio de reclutamiento de STAT, un dominio de reclutamiento de AP1, un dominio de reclutamiento de Myc/Max o un dominio de reclutamiento de NFκB. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento es un dominio de reclutamiento (activador de STAT) del transductor de señal y activador de la transcripción (STAT), por ejemplo, de colas de receptor (colas citoplasmáticas) o de colas de receptor de citocina. Estos dominios de reclutamiento intracelulares de los CACCR de la descripción

10 permiten la propagación de la señal 3 en una célula inmunitaria que comprende un CAR de BCMA y un receptor quimérico de citocina (por ejemplo, una célula T con CAR de BCMA con un receptor quimérico de citocina de la descripción). La señalización de citocinas propagada a través del dominio de reclutamiento de STAT permite la potenciación inmunitaria de la célula basada en citocinas. En algunas modalidades, la potenciación inmunitaria es homeostática, por ejemplo, la señalización da lugar a un aumento de las células inmunitarias que tienen el CAR. En algunas modalidades, la potenciación inmunitaria es inflamatoria, por ejemplo, la señalización da lugar a un aumento en la potencia de las células inmunitarias que tienen el CAR. En algunas modalidades, la potenciación inmunitaria evita el agotamiento, por ejemplo, la señalización mantiene la funcionalidad a largo plazo de

15 las células inmunitarias que tienen el CAR.

20

25

En algunas modalidades, los dominios de reclutamiento de la descripción son sintéticos y no se parecen a ningún fragmento de receptor de origen natural. En algunas modalidades, la potenciación inmunitaria evita el agotamiento, por ejemplo, la señalización mantiene la funcionalidad a largo plazo de las células inmunitarias que tienen el CAR de BCMA.

30

En algunas modalidades, los dominios de reclutamiento de Stat de la descripción son sintéticos y no se parecen a ningún fragmento de receptor de origen natural.

En otras modalidades, los dominios de reclutamiento de Stat de la descripción se derivan de las colas citoplasmáticas de los receptores de origen natural, por ejemplo, los derivados de los receptores de citocinas de origen natural. Estas colas citoplasmáticas de receptores de origen natural pueden ser las regiones secuencia abajo de los dominios activadores de JAK del dominio transmembrana del receptor. Los dominios de reclutamiento de Stat de los receptores quiméricos de citocinas comprenden al menos un dominio de reclutamiento de STAT de al menos un receptor. En algunas modalidades, el dominio de

35

reclutamiento de Stat comprende al menos un dominio de reclutamiento de STAT1. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de Stat comprende al menos un dominio de reclutamiento de STAT2. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de Stat comprende al menos un dominio de reclutamiento de STAT3. En algunas modalidades, el

5 dominio de reclutamiento de Stat comprende al menos un dominio de reclutamiento de STAT4. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de Stat comprende al menos un dominio de reclutamiento de STAT5. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de Stat comprende al menos un dominio de reclutamiento de STAT6. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de Stat comprende al menos un dominio

10 de reclutamiento de STAT7.

En algunas modalidades, el receptor de origen natural del que se deriva el dominio de reclutamiento de Stat, no es un receptor de citocina.

En algunas modalidades, el receptor de origen natural del que se deriva el dominio de reclutamiento de Stat, es un receptor de citocina. Los receptores de citocinas ilustrativos

15 a través de los cuales las citocinas potenciadoras de la inmunidad de las células T emiten señales incluyen, pero no se limitan a, el receptor de IL-2, el receptor de IL-7, el receptor de IL-12, el receptor de IL-15 y el receptor de IL-21. En modalidades alternativas, el receptor del que se deriva el dominio de reclutamiento de Stat no es un receptor de citocina. Al elegir el dominio de reclutamiento de Stat del CACCR, el receptor puede redirigirse a la

20 señalización de su elección.

En algunas modalidades, el CACCR de la descripción comprende un dominio de reclutamiento conectado al extremo C-terminal del dominio de unión a JAK2/transmembrana, con o sin un enlazador. En algunas modalidades, el enlazador comprende uno o más residuos de aminoácidos.

25 La Tabla 2a proporciona los receptores ilustrativos de los que se derivan los dominios de reclutamiento de los CACCR de la descripción. La Tabla 2b proporciona las secuencias de aminoácidos ilustrativas de los dominios de reclutamiento de la descripción. En algunas modalidades, el CACCR de la descripción comprende un dominio de reclutamiento que comprende la secuencia de aminoácidos que se selecciona de una o más de las secuencias

30 del receptor en la Tabla 2b. En algunas modalidades, el CACCR de la descripción comprende un dominio de reclutamiento que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a cualquiera de las secuencias de la Tabla 2b.

Tabla 2a. Receptores ilustrativos

	Fuente de dominios de reclutamiento
	BLNK
	IL2RG
5	EGFR
	EpoR
	GHR
	IFNAR1
	IFNAR2
10	IFNAR1/2
	IFNLR1
	IL10R1
	IL12Rb1
	IL12Rb2
15	IL21R
	IL2Rb
	IL2pequeña
	IL7R
	IL7Ra
20	IL9R
	IL15R
	IL21R

Tabla 2b. Secuencias de dominios de reclutamiento (colas citoplasmáticas)

25	Secuencias de colas citoplasmáticas	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
30	IL7R(316-459)	ARDEVEGFLQDTFPQQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSE DVVITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSSSRSLDCR ESGKNGPHVYQDLLLSLGTNSTLPPPFSLQSGILTLP VAQQQPILTSLGSNQEEAYVTMSSFYQNNQ	46
35	IL2Rb(333-551)	VTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLP DALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPL QPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPG GSGAGEERMPPSLQERVPRDWDQPQLGPPTPGVPDL VDFQPPPELVLRAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPG QGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV	47

	Secuencias de colas citoplasmáticas	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
5	IFNAR1(508-557)	ISTIATVEETNQTDEDHKKYSSQTSQDSGNYSNEDESE SKTSEELQQDFV	48
	IFNAR2(310-515)	KKKVWDYNYDDES DSDTEAAPRTSGGGYTMHGLTVR PLGQASATSTESQLIDPESEEEEPDLPEVDVELPTMPKD SPQQLELLSGPCERRKSPLQDPFPEEDYSSTEGSGGRI TFNVDLNSVFLRVLDDESDDDLEAPLMLSSHLEEMVDP EDPDNVQSNHLLASGEGTQPTFPSPSSEGLWSEDAPS DQSDTSES DVDLGDGYIMR	49
10			
15	IFNAR1/2(residuos de IFNAR1 508-557-residuos de IFNAR2 310-515)	ISTIATVEETNQTDEDHKKYSSQTSQDSGNYSNEDESE SKTSEELQQDFVKKKVWDYNYDDES DSDTEAAPRTSG GGYTMHGLTVRPLGQASATSTESQLIDPESEEEEPDLPE VDVELPTMPKDSPQQLELLSGPCERRKSPLQDPFPEE DYSSTEGSGGRITFNVDLNSVFLRVLDDESDDDLEAPL MLSSHLEEMVDPEDPDNVQSNHLLASGEGTQPTFPSP SSEGLWSEDAPSDQSDTSES DVDLGDGYIMR	50
20	IFNLR1(300-520)	RGVRPTPRVRAPATQQTRWKKDLAEDEEEDEEDTED GVSFQPYIEPPSFLGQEHQAPGHSEAGGVDSGRPRAP LVPSEGSSAWDSSDRSWASTVDSSWDRAGSSGYLAE KGPGQGPGGDGHQESLPPPEFSKDSGFLEELPEDNLS SWATWGTLPPPEPNLVPGGPPVSLQTLFCWESSPEEE EEARESEIEDSDAGSWGAEESTQRTEDRGRTLGHYMAR	51
25	IL2RG (335-369)	IPPKGGALGEGPGASPCNQHSPYWAPPCYTLKPET	52
	IL9R(356-521)	TALLTCGPARPWKSVALEEEQEGPGTRLPGNLSSDEV LPAGCTEWRVQTLAYLPQEDWAPTSLTRPAPPDSEGS RSSSSSSSSNNNNYCALGCYGGWHL SALPGNTQSSG PIPALACGLSCDHQGLETTQQGVAVWLAGHCQRPGHE DLQGMLLPSVLSKARSWTF	53
30			
35	IL21R(322-538)	PRSPAKRLQLTELQEPALVESDGVKPSFWPTAQNS GGSAYSEERDRPYGLVSI DTVTVLDAEGPCTWPCSCE DDGYPALDL DAGLEPSPGLEDPLLDAGTTVLSCGCVSA GSPGLGGPLGSLLDRLKPPLADGEDWAGGLPWGGRS PGGVSESEAGSPLAGLMDTFD SGFVGSDCSSPVECD FTSPGDEGPPRSYLRQWVIPPPLSSPGPQAS	54
	GHR(353-638)	PDEKTEESDTRLLSSDHEKSHSNLGVKDGDSGRTSC CEPDILETDFNANDIHEGTSEVAQPQRLKGEADLLCLD	55

	Secuencias de colas citoplasmáticas	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
5		QKNQNNSPYHDACPATQQPSVIAEKNKPQLPTEGA ESTHQAAHIQLSNPSSLSNIDFYAQVSDITPAGSVVLSP GQKNKAGMSQCDMHPEMVSLCQENFLMDNAYFCEAD AKKCIPVAPHIKVESHIQPSLNQEDIYITTESLTAAGRP GTGEHVPGSEMPVPDYTSIHIVQSPQGLILNATALPLPD KEFLSSCGYVSTDQLNKIMP	
10	EpoR(339-508)	WGTMQAVEPGTDDEGPLLEPVGSEHAQDTYLVLDKW LLPRNPPSEDLPGPGGSDIVAMDEGSEASSCSSALAS KPSPEGASAASFETYILDPSQLLRPWTLCPPLPTTP HLKYLYLVVSDSGISTDYSSGDSQGAQGGLSDGPYSN PYENSLIPAAEPLPPSYVACS	56
15	IL2Rb(337-539) murino	AVQLLLLQKDSAPLPSPSGHSQASCFTNQGYFFFHLPN ALEIESCQVYFTYDPCVEEEVEEDGSRLPEGSPHPPLL PLAGEQDDYCAFPPRDDLFLFSPSLSTPNTAYGGSRAP EERSPLSLHEGLPSLASRDLMGLQRPLERMPEGDGEG LSANSSGEQASVPEGNLHGQDQDRGQGPILTNTDAY LSLQELQAQDSVHLI	57
20	IL7Ra(316-459) murino	ARDEVESFLPNDLPAQPEELETQGHRAAVHSANRSPE TSVSPPETVRRESPLRCLARNLSTCNAPLLSSRSPDY RDGDRNRPPVYQDLLPNSGNTNVPVPVQPLPFQSGI LIPVSQRQPISTSSVLNQEEAYVTMSSFYQNK	58
25	EGFR(955-1186)	VIQGDERMHLPSPTDNSFYRALMDEEDMDDVVDADEY LIPQQGFFSSPSTSRTPLLSSLSATSNNSTVACIDRNL QSCPIKEDSFLQRYSSDPTGALTEDSIDDFTLPVPEYIN QSVPKRPAGSVQNPVYHNQPLNPAPSRDPHYQDPHS TAVGNPEYLNTVQPTCVNSTFDSPAHWAKGSHQISL DNPDYQQDFFPKEAKPNGIFKGSTAENAEYLRVAPQS SEFIGA	59
30			
35	EGFR(955- 1186;Y974F,d104 5-1057)	VIQGDERMHLPSPTDNSFFRALMDEEDMDDVVDADEY LIPQQGFFSSPSTSRTPLLSSLSATSNNSTVACIDRNL QSCPIKEDSFLQRIDDTFLPVPEYINQSVPKRPAGSVQN PVYHNQPLNPAPSRDPHYQDPHSTAVGNPEYLNTVQP TCVNSTFDSPAHWAKGSHQISLDNPDYQQDFFPKEA KPNGIFKGSTAENAEYLRVAPQSSEFIGA	60

	Secuencias de colas citoplasmáticas	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
5	EGFR(955-1009;Y974F)	VIQGDERMHLPSPTDSNFFRALMDEEDMDDVVDADEY LIPQQGFFSSPSTS RTP	61
	EGFR(1019-1085)	NNSTVACIDRNLQSCPIKEDSFLQRIDDTFLPVPEYIN QSVPKRPAGSVQNPV	62
10	EGFR(1037-1103;Y1068/1101 F,d1045-1057)	KEDSFLQRIDDTFLPVPEFINQSVPKRPAGSVQNPVYH NQPLNPAPSRDPHFQD	63
	EGFR(1066-1118;Y1068/1086 F)	VPEFINQSVPKRPAGSVQNPVFHNQPLNPAPSRDPHY QDPHSTAVGNPEYLNTV	64
15	EGFR(1122-1165)	PEYLNTVQPTCVNSTFDSPAHWAKGSHQISLDNP DY QQDFFPKEAKPNGIFKG	65
	EGFR(1133-1186;Y1148F)	WAQKGSHQISLDNP DFQQDFFPKEAKPNGIFKGSTAE NAEYLRVAPQSSEFIGA	66
20	IL12Rb2(775-825)	SDPKPENPACPWTVLPAGDLPTH DGYLPSNIDDLPSHE APLADSLEELEPQ	67
	IL7Ra(376-416)	ACDAPILSSSRSLDCRESGKNGPHVYQDLLLSL GTTNS TLP	68
25	IL7Ra(424-459)	GILTLNPVAQQQPILTS LGSNQEEAYVTMSSFYQNNQ	69
	IL7Ra(376-416,424-459)	ACDAPILSSSRSLDCRESGKNGPHVYQDLLLSL GTTNS TLPQQQPILTS LGSNQEEAYVTMSSFYQNNQ	70
30	IL7Ra(424-459;Y456F)	GILTLNPVAQQQPILTS LGSNQEEAYVTMSSFFQNNQ	71
	IL7R(376-416,424-459,Y456F)	ACDAPILSSSRSLDCRESGKNGPHVYQDLLLSL GTTNS TLPQQQPILTS LGSNQEEAYVTMSSFFQNNQ	72
35	IL2Rbpequeño(393-433)	DEGVAGAPTGSSPQPLQLSGEDDAYCTFPSRDDL LL FSPSGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDP THLV	73
	IL2Rbpequeño(518-551)	GQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDP THLV	74
35	IL2Rbpequeño(339-379,393-433)	QQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIE ACQDEGVAGAPTGSSPQPLQLSGEDDAYCTFPSRDD LLLFSPS	75
	IL2Rbpequeño(339-379,518-551)	QQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIE ACQ GQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDP THLV	76

	Secuencias de colas citoplasmáticas	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
5	IL2Rbpequeño(39 3-433,518-551)	DEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLL FSPSGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV	77
	IL2Rbpequeño(33 9-379,393- 433,518-551)	QQDKVPEPASLSSNHSLSCTFNQGYFFFHLPDALEIE ACQDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDD LLLFSPSGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPT HLV	78
10	IFNAR2pequeño(3 10-352)	KKKVWDYNYDDESDDTEAAPRTSGGGYTMHGLTVR PLGQASA	79
	IFNAR2pequeño(4 86-515)	EGLWSEDAPSDQSDTSESDVDLGDGYIMR	80
15	IFNAR2pequeño(3 10-352,486-515)	KKKVWDYNYDDESDDTEAAPRTSGGGYTMHGLTVR PLGQASA EGLWSEDAPSDQSDTSESDVDLGDGYIMR	81
	BLNK(53-208)	ASESPADEEEQWSDDFDSYENPDEHSDSEMYVMPA EENADDSYEPPPVEQETRPVHPALPFARGEYIDNRSS QRHSPPFSKTLPSKPSWPSEKARLTSTLPALTALQKPQ VPPKPKGLLEDEADYVVPVEDNDENYIHPTESSPPPE KAPMVNR	82
20	BLNK(53- 208;Y72F)	ASESPADEEEQWSDDFDSDFENPDEHSDSEMYVMPA EENADDSYEPPPVEQETRPVHPALPFARGEYIDNRSS QRHSPPFSKTLPSKPSWPSEKARLTSTLPALTALQKPQ VPPKPKGLLEDEADYVVPVEDNDENYIHPTESSPPPE KAPMVNR	83
	BLNK(53- 208;Y72F,Y96F)	ASESPADEEEQWSDDFDSDFENPDEHSDSEMYVMPA EENADDSFEPPPVEQETRPVHPALPFARGEYIDNRSSQ RHSPPFSTLPSKPSWPSEKARLTSTLPALTALQKPQV PPKPKGLLEDEADYVVPVEDNDENYIHPTESSPPPEK APMVNR	84
25	EpoR(339-508)	WGTMQAVEPGTDDEGPLLEPVGSEHAQDTYLVLDKW LLPRNPPSEDLPGPGGSDIVAMDEGSEASSCSALAS KPSPEGASAAFEYTILDPSSQLLRPWTLCPPTPP HLKYLYLVVSDSGISTDYSSGDSQGAQGGLSDGPYSN PYENSLIPAAEPLPPSYVACS	85
	IL12Rb2(714-862)	VTPVFRHPPCSNWPQREKGIQGHQASEKDMMHSAASS PPPPRALQAESRQLVDLYKVLESRGSDPKPENPACPW	86

	Secuencias de colas citoplasmáticas	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
5		TVLPAGDLPTHGYLPSNIDDLPSHEAPLADSLEELEPQ HISLSVFPSSSLHPLTFSCGDKLTLDQLKMRCDSLML	
	IL12Rb1(622-662)	WDKGERTEPLEKTELPEGAPELALDTELSLEDGDRCKA KM	87
10		VSPKLNLDLHGSTDGFGSTKPSLQTEEPQFLLPDPH PQADRTLGNREPPVLGDSCSSGSSNSTDSGICLQEPS LSPSTGPTWEQQVGSNSRGQDDSGIDLQVNSEGRAG DTQGGGALGHHSPPEPEVPGEEDPAAVAFQGYLRQTR CAEEKATKTGCLEEEESPLTDGLGPKFGRCLVDEAGLHP PALAKGYLKQDPLEMTLASSGAPTQQWNQPTTEWSLL ALSSCSDLGISDWSFAHDLAPLGCVAAPGGLLGSFNSD LVTLPPLISSLQSSE	88
15			
20	IL2Rb(333-551, Y381S,Y384S,Y387S)	VTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFHLP DALEIEACQV <u>S</u> FT <u>S</u> DP <u>S</u> SEEDPDEGVAGAPTGSSPQPL QPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPG GSGAGEERMPPSLQERVPRDWDQPLGPPTPGVPDL VDFQPPPELVREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPG QGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV	106
25	IL2Rb(333-551, Y364S,Y381S,Y384S,Y387S)	VTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGS <u>S</u> FFHLP DALEIEACQV <u>S</u> FT <u>S</u> DP <u>S</u> SEEDPDEGVAGAPTGSSPQPL QPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPG GSGAGEERMPPSLQERVPRDWDQPLGPPTPGVPDL VDFQPPPELVREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPG QGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV	142

30 En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de Stat de un CACCR de la descripción comprende un dominio de reclutamiento de STAT de un receptor.

Para generar múltiples salidas, pueden unirse dos o más dominios de reclutamiento de STAT en tándem para imitar la señalización de una o más citocinas.

35 En algunas modalidades, los dos o más dominios de reclutamiento de STAT pueden unirse junto con o sin un enlazador. En algunas modalidades, el enlazador comprende uno o más residuos de aminoácidos.

En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT comprende porciones de más de un receptor, por ejemplo, que comprende más de un dominio de reclutamiento de STAT. En tales modalidades, se proporciona un dominio de señalización

de citocinas en tándem, lo que permite una señalización mejorada. En consecuencia, en algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de un monómero del CACCR de la descripción comprende los dominios de reclutamiento de STAT de más de un receptor, por ejemplo, comprende los dominios de reclutamiento de STAT de dos, tres, cuatro, cinco o incluso seis receptores. Por ejemplo, en algunas modalidades, los dominios de reclutamiento de STAT pueden unirse en tándem para estimular múltiples vías (por ejemplo, la fusión del fragmento IL7R(316-459)-IL12Rb2(775-825) para STAT5 propersistencia y STAT4 proinflamatorio; IL7R(316-459)-IL2Rb pequeño(393-433,518-551) para propersistencia; IL7R(316-459)-EGFR(1122-1165) para pro-persistencia y antiagotamiento; IL2Rbpequeño(393-433,518-551)-EGFR(1122-1165) para propersistencia y antiagotamiento).

Cuando se generan múltiples salidas, la proximidad de los dominios de reclutamiento de STAT individuales a la membrana celular puede influir en la fuerza de sus respectivas salidas de señalización. La Tabla 2c muestra los ejemplos de los CACCR con salidas dobles, donde cada salida puede colocarse proximal o distal a la membrana celular. En algunas modalidades, los CACCR de la descripción comprenden un dominio de reclutamiento con salidas dobles que se seleccionan de la Tabla 2c.

Tabla 2c: Ejemplos de los CACCR con salidas dobles

	Dominio de reclutamiento de STAT de salida doble	Membrana proximal	Membrana distal
20	IL2Rbpequeño(393-433,518-551)/ IL21R(322-538)	IL2Rbpequeño(393-433,518-551)	IL21R(322-538)
25	IL2Rb(333-551)/ IL21R(322-538)	IL2Rb(333-551)	IL21R(322-538)
	IL21R(322-538)/ IL2Rbpequeño(393-433,518-551)	IL21R(322-538)	IL2Rbpequeño(393-433,518-551)
30	IL21R(322-538)/ IL2Rb(333-551)	IL21R(322-538)	IL2Rb(333-551)
	IL2Rbpequeño(339-379,393-433,518-551)/IL21R(322-538)	IL2Rbpequeño(339-379,393-433,518-551)	IL21R(322-538)
35	IL21R(322-538)/ IL2Rbpequeño(339-379,393-433,518-551)	IL21R(322-538)	IL2Rbpequeño(339-379,393-433,518-551)

	Dominio de reclutamiento de STAT de salida doble	Membrana proximal	Membrana distal
5	IL2Rb(333-551)/ IL12Rb1(622-662)	IL2Rb(333-551)	IL12Rb1(622-662)
	IL2Rbpequeño(393-433,518-551)/ IL12Rb1(622-662)	IL2Rbpequeño(393-433,518-551)	IL12Rb1(622-662)
10	IL2Rbpequeño(339-379,393-433,518-551)/IL12Rb1(622-662)	IL2Rbpequeño(339-379,393-433,518-551)	IL12Rb1(622-662)
	IL12Rb1(622-662)/ IL2Rb(333-551)	IL12Rb1(622-662)	IL2Rb(333-551)
15	IL12Rb1(622-662)/IL2Rbpequeño(393-433,518-551)	IL12Rb1(622-662)	IL2Rbpequeño(393-433,518-551)
	IL12Rb1(622-662)/IL2Rbpequeño(339-379,393-433,518-551)	IL12Rb1(622-662)	IL2Rbpequeño(339-379,393-433,518-551)
20	IL2Rb(333-551)/ IL12Rb2(714-862)	IL2Rb(333-551)	IL12Rb2(714-862)
	IL2Rbpequeño(393-433,518-551)/ IL12Rb2(714-862)	IL2Rbpequeño(393-433,518-551)	IL12Rb2(714-862)
25	IL2Rbpequeño(339-379,393-433,518-551)/IL12Rb2(714-862)	IL2Rbpequeño(339-379,393-433,518-551)	IL12Rb2(714-862)
	IL2Rb(333-551)/ IL12Rb2(775-825)	IL2Rb(333-551)	IL12Rb2(775-825)
30	IL2Rbpequeño(393-433,518-551)/ IL12Rb2(775-825)	IL2Rbpequeño(393-433,518-551)	IL12Rb2(775-825)
	IL2Rbpequeño(339-379,393-433,518-551)/IL12Rb2(775-825)	IL2Rbpequeño(339-379,393-433,518-551)	IL12Rb2(775-825)

	Dominio de reclutamiento de STAT de salida doble	Membrana proximal	Membrana distal
5	IL12Rb2(714-862)/ IL2Rb(333-551)	IL12Rb2(714-862)	IL2Rb(333-551)
	IL12Rb2(714-862)/IL2Rbpequeño(393-433,518-551)	IL12Rb2(714-862)	IL2Rbpequeño(393-433,518-551)
10	IL12Rb2(714-862)/IL2Rbpequeño(339-379,393-433,518-551)	IL12Rb2(714-862)	IL2Rbpequeño(339-379,393-433,518-551)
	IL12Rb2(775-825)/ IL2Rb(333-551)	IL12Rb2(775-825)	IL2Rb(333-551)
15	IL12Rb2(775-825)/IL2Rbpequeño(393-433,518-551)	IL12Rb2(775-825)	IL2Rbpequeño(393-433,518-551)
	IL12Rb2(775-825)/IL2Rbpequeño(339-379,393-433,518-551)	IL12Rb2(775-825)	IL2Rbpequeño(339-379,393-433,518-551)
20	IL7Ra (316-459)/IL21R(322-538)	IL7Ra (316-459)	IL21R(322-538)
	IL7Ra (376-416, 424-459, Y456F)/IL21R(322-538)	IL7Ra (376-416, 424-459, Y456F)	IL21R(322-538)
25	IL21R(322-538)/IL7Ra (316-459)	IL21R(322-538)	IL7Ra (316-459)
	IL21R(322-538)/IL7Ra(376-416, 424-459, Y456F)	IL21R(322-538)	IL7Ra (376-416, 424-459, Y456F)
30	IL7Ra (316-459)/IL12Rb1(622-662)	IL7Ra (316-459)	IL12Rb1(622-662)
	IL7Ra (376-416, 424-459, Y456F)/IL12Rb1(622-662)	IL7Ra (376-416, 424-459, Y456F)	IL12Rb1(622-662)
35	IL7Ra (316-459)/IL12Rb2(714-862)	IL7Ra (316-459)	IL12Rb2(714-862)

	Dominio de reclutamiento de STAT de salida doble	Membrana proximal	Membrana distal
5	IL7Ra (376-416, 424-459, Y456F)/IL12Rb2(714-862)	IL7Ra (376-416, 424-459, Y456F)	IL12Rb2(714-862)
	IL7Ra (316-459)/IL12Rb2(775-825)	IL7Ra (316-459)	IL12Rb2(775-825)
10	IL7Ra (376-416, 424-459, Y456F)/IL12Rb2(775-825)	IL7Ra (376-416, 424-459, Y456F)	IL12Rb2(775-825)
	IL12Rb1(622-662)/ IL7Ra (316-459)	IL12Rb1(622-662)	IL7Ra (316-459)
15	IL12Rb1(622-662)/IL7Ra (376-416, 424-459, Y456F)	IL12Rb1(622-662)	IL7Ra (376-416, 424-459, Y456F)
	IL12Rb2(714-862)/ IL7Ra (316-459)	IL12Rb2(714-862)	IL7Ra (316-459)
20	IL12Rb2(714-862)/IL7Ra (376-416, 424-459, Y456F)	IL12Rb2(714-862)	IL7Ra (376-416, 424-459, Y456F)
	IL12Rb2(775-825)/ IL7Ra (316-459)	IL12Rb2(775-825)	IL7Ra (316-459)
25	IL12Rb2(775-825)/IL7Ra (376-416, 424-459, Y456F)	IL12Rb2(775-825)	IL7Ra (376-416, 424-459, Y456F)
	IL7Ra (316-459)/IL2Rb(333-551)	IL7Ra (316-459)	IL2Rb(333-551)
30	IL7Ra (376-416, 424-459, Y456F)/IL2Rb(333-551)	IL7Ra (376-416, 424-459, Y456F)	IL2Rb(333-551)
	IL7Ra (316-459)/IL2Rbpequeño(393-433, 518-551)	IL7Ra (316-459)	IL2Rbpequeño(393-433, 518-551)
35	IL7Ra (376-416, 424-459, Y456F)/IL2Rbpequeño(393-433, 518-551)	IL7Ra (376-416, 424-459, Y456F)	IL2Rbpequeño(393-433, 518-551)
	IL7Ra (316-459)/IL2Rbpequeño(339-379, 393-433, 518-551)	IL7Ra (316-459)	IL2Rbpequeño(339-379,

	Dominio de reclutamiento de STAT de salida doble	Membrana proximal	Membrana distal
			393-433, 518-551)
5	IL7Ra (376-416, 424-459, Y456F)/IL2Rbpequeño(339-379, 393-433, 518-551)	IL7Ra (376-416, 424-459, Y456F)	IL2Rbpequeño(339-379, 393-433, 518-551)
10	IL2Rb(333-551)/IL7Ra (316-459)	IL2Rb(333-551)	IL7Ra (316-459)
	IL2Rb(333-551)/ IL7Ra (376-416, 424-459, Y456F)	IL2Rb(333-551)	IL7Ra (376-416, 424-459, Y456F)
15	IL2Rbpequeño(393-433, 518-551)/IL7Ra (316-459)	IL2Rbpequeño(393-433, 518-551)	IL7Ra (316-459)
	IL2Rbpequeño(393-433, 518-551)/ IL7Ra (376-416, 424-459, Y456F)	IL2Rbpequeño(393-433, 518-551)	IL7Ra (376-416, 424-459, Y456F)
20	IL2Rbpequeño(339-379, 393-433, 518-551)/IL7Ra (316-459)	IL2Rbpequeño(339-379, 393-433, 518-551)	IL7Ra (316-459)
25	IL2Rbpequeño(339-379, 393-433, 518-551)/ IL7Ra (376-416, 424-459, Y456F)	IL2Rbpequeño(339-379, 393-433, 518-551)	IL7Ra (376-416, 424-459, Y456F)
	IL12Rb1(622-662)/ IL21R (322-538)	IL12Rb1(622-662)	IL21R(322-538)
30	IL12Rb2(714-862)/ IL21R (322-538)	IL12Rb2(714-862)	IL21R(322-538)
	IL12Rb2(775-825)/ IL21R (322-538)	IL12Rb2(775-825)	IL21R(322-538)
35	IL21R (322-538)/ IL12Rb1(622-662)	IL21R(322-538)	IL12Rb1(622-662)
	IL21R (322-538)/ IL12Rb2(714-862)	IL21R(322-538)	IL12Rb2(714-862)

Dominio de reclutamiento de STAT de salida doble	Membrana proximal	Membrana distal
IL21R (322-538)/ IL12Rb2(775-825)	IL21R(322-538)	IL12Rb2(775-825)

5

Sin estar ligado a la teoría o al mecanismo, en algunas modalidades, una proteína JAK (JAK1, JAK2, JAK3 o TYK2) se une a un CACCR dimerizado de la descripción. Las dos proteínas JAK unidas se activan, las cuales son capaces de fosforilar residuos de tirosina en el dominio de reclutamiento del CACCR. Los dominios de reclutamiento fosforilados son entonces capaces de unirse a las proteínas reclutadas (por ejemplo, un dominio de reclutamiento de STAT fosforilado se une a una proteína de STAT), que a su vez efectúan los eventos de transcripción en el núcleo.

10

D. CACCR ilustrativos

15

La Tabla 3 muestra las secuencias ilustrativas de CACCR de la descripción. Los receptores pueden expresarse con una secuencia señal, por ejemplo, un CD8SS de secuencia MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 89).

20

En algunas modalidades, el CACCR de la descripción comprende cualquiera de las secuencias en la Tabla 3. En algunas modalidades, el CACCR comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 90-98 y 107-139. En algunas modalidades, el CACCR de la descripción comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 90-100, 107-139, 143 y 180-186.

25

En algunas modalidades, el CACCR comprende el dominio transmembrana y/o el dominio de unión a JAK derivado del receptor TPOR/MPLR. En algunas modalidades, el CACCR de la descripción comprende los aminoácidos 478 – 582 del receptor TPOR/MPLR de origen natural de la SEQ ID NO: 6. En algunas modalidades, el CACCR de la descripción comprende la secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17. En algunas modalidades, el CACCR de la descripción comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17. En algunas modalidades, el CACCR comprende además un dominio de reclutamiento que comprende la secuencia de aminoácidos de una o más de las secuencias de receptor presentadas en la Tabla 2b. En algunas modalidades, el CACCR comprende además uno o más dominios de reclutamiento que se seleccionan del grupo que consiste en los dominios de reclutamiento de STAT de IL7Ra, IL2Rb, IL12Rb1, IL12Rb2 e IL21R. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento comprende el dominio de reclutamiento de STAT de IL7Ra. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL7Ra comprende la secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia

30

35

- de aminoácidos de la SEQ ID NO: 46, 68, 69, 70, 71 o 72. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL7Ra comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 46, 68, 69, 70, 71 o 72. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento comprende el dominio de reclutamiento de STAT de IL2Rb. En algunas modalidades, el
- 5** dominio de reclutamiento de STAT de IL2Rb comprende la secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 106 o 142. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL2Rb comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 106 o 142. En
- 10** algunas modalidades, el dominio de reclutamiento comprende el dominio de reclutamiento de STAT de IL12Rb1 o IL12Rb2. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL12Rb1 o IL12Rb2 comprende la secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67, 86 u 87. En algunas modalidades, el dominio de
- 15** reclutamiento de STAT de IL12Rb1 o IL12Rb2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67, 86 u 87. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento comprende el dominio de reclutamiento de STAT de IL21R. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL21R comprende la secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia
- 20** de aminoácidos de la SEQ ID NO: 54. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL21R comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 54. En algunas modalidades, el CACCR comprende uno o más dominios de reclutamiento presentados en la Tabla 2c. En algunas modalidades, los dominios de reclutamiento comprenden los dominios de reclutamiento de STAT de IL7Ra e IL2Rb. En algunas
- 25** modalidades, el dominio de reclutamiento comprende los dominios de reclutamiento de STAT de IL7Ra e IL12Rb1. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento comprende los dominios de reclutamiento de STAT de IL7Ra e IL12Rb2. En algunas modalidades, el CACCR comprende la secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia
- 30** de aminoácidos de la SEQ ID NO: 90 o 119, con o sin una secuencia señal. En algunas modalidades, el CACCR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 90 o 119, con o sin una secuencia señal.

- En algunas modalidades, el CACCR de la descripción comprende el dominio transmembrana y/o el dominio de unión a JAK de un receptor TPOR/MPLR que comprende
- 35** una o más sustituciones de aminoácidos en H499, S505, G509 o W515. En algunas modalidades, el receptor TPOR/MPLR comprende una sustitución H499L. En algunas modalidades, el receptor TPOR/MPLR comprende una sustitución S505N. En algunas modalidades, el receptor TPOR/MPLR comprende una sustitución G509N. En algunas modalidades, el receptor TPOR/MPLR comprende una sustitución W515K. En algunas

- modalidades, el CACCR comprende además un dominio de reclutamiento que comprende la secuencia de aminoácidos de una o más de las secuencias de receptor presentadas en la Tabla 2b. En algunas modalidades, el CACCR comprende además uno o más dominios de reclutamiento que se seleccionan del grupo que consiste en los dominios de reclutamiento de STAT de IL7Ra, IL2Rb, IL12Rb1, IL12Rb2 e IL21R. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento comprende el dominio de reclutamiento de STAT de IL7Ra. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL7Ra comprende la secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 46, 68, 69, 70, 71 o 72. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL7Ra comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 46, 68, 69, 70, 71 o 72. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento comprende el dominio de reclutamiento de STAT de IL2Rb. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL2Rb comprende la secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 106 o 142. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL2Rb comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 106 o 142. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento comprende el dominio de reclutamiento de STAT de IL12Rb1 o IL12Rb2. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL12Rb1 o IL12Rb2 comprende la secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67, 86 u 87. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL12Rb1 o IL12Rb2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67, 86 u 87. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento comprende el dominio de reclutamiento de STAT de IL21R. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL21R comprende la secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 54. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL21R comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 54. En algunas modalidades, el CACCR comprende uno o más dominios de reclutamiento presentados en la Tabla 2c. En algunas modalidades, los dominios de reclutamiento comprenden los dominios de reclutamiento de STAT de IL7Ra e IL2Rb. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento comprende los dominios de reclutamiento de STAT de IL7Ra e IL12Rb1. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento comprende los dominios de reclutamiento de STAT de IL7Ra e IL12Rb2. En algunas modalidades, el CACCR comprende la secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 92, 94, 121 o 123, con o sin una secuencia señal. En algunas modalidades, el

CACCR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 92, 94, 121 o 123, con o sin una secuencia señal.

- En algunas modalidades, el CACCR de la descripción comprende el dominio transmembrana y/o el dominio de unión a JAK de un receptor TPOR/MPLR que comprende
- 5** las sustituciones H499L y S505N. En algunas modalidades, el CACCR comprende además un dominio de reclutamiento que comprende la secuencia de aminoácidos de una o más de las secuencias de receptor presentadas en la Tabla 2b. En algunas modalidades, el CACCR comprende además uno o más dominios de reclutamiento que se seleccionan del grupo que consiste en los dominios de reclutamiento de STAT de IL7Ra, IL2Rb, IL12Rb1, IL12Rb2 e
- 10** IL21R. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento comprende el dominio de reclutamiento de STAT de IL7Ra. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL7Ra comprende la secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 46, 68, 69, 70, 71 o 72. En algunas modalidades, el dominio de
- 15** reclutamiento de STAT de IL7Ra comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 46, 68, 69, 70, 71 o 72. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento comprende el dominio de reclutamiento de STAT de IL2Rb. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL2Rb comprende la secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia
- 20** de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 106 o 142. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL2Rb comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 106 o 142. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento comprende el dominio de reclutamiento de STAT de IL12Rb1 o IL12Rb2. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de
- 25** IL12Rb1 o IL12Rb2 comprende la secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67, 86 u 87. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL12Rb1 o IL12Rb2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67, 86 u 87. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento comprende
- 30** el dominio de reclutamiento de STAT de IL21R. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL21R comprende la secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 54. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL21R comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 54. En
- 35** algunas modalidades, el CACCR comprende uno o más dominios de reclutamiento presentados en la Tabla 2c. En algunas modalidades, los dominios de reclutamiento comprenden los dominios de reclutamiento de STAT de IL7Ra e IL2Rb. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento comprende los dominios de reclutamiento de STAT de IL7Ra e IL12Rb1. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento

comprende los dominios de reclutamiento de STAT de IL7Ra e IL12Rb2. En algunas modalidades, el CACCR comprende la secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 91, 98, 120 o 127, con o sin una secuencia señal. En algunas modalidades, el CACCR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 91, 98, 120 o 127, con o sin una secuencia señal.

- En algunas modalidades, el CACCR de la descripción comprende el dominio transmembrana y/o el dominio de unión a JAK de un receptor TPOR/MPLR que comprende las sustituciones H499L y W515K o las sustituciones H499L y G509N. En algunas modalidades, el CACCR comprende además un dominio de reclutamiento que comprende la secuencia de aminoácidos de una o más de las secuencias de receptor presentadas en la Tabla 2b. En algunas modalidades, el CACCR comprende además uno o más dominios de reclutamiento que se seleccionan del grupo que consiste en los dominios de reclutamiento de STAT de IL7Ra, IL2Rb, IL12Rb1, IL12Rb2 e IL21R. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento comprende el dominio de reclutamiento de STAT de IL7Ra. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL7Ra comprende la secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 46, 68, 69, 70, 71 o 72. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL7Ra comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 46, 68, 69, 70, 71 o 72. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento comprende el dominio de reclutamiento de STAT de IL2Rb. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL2Rb comprende la secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 106 o 142. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL2Rb comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 106 o 142. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento comprende el dominio de reclutamiento de STAT de IL12Rb1 o IL12Rb2. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL12Rb1 o IL12Rb2 comprende la secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67, 86 u 87. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL12Rb1 o IL12Rb2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67, 86 u 87. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento comprende el dominio de reclutamiento de STAT de IL21R. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL21R comprende la secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 54. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL21R comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 54. En algunas

modalidades, el CACCR comprende uno o más dominios de reclutamiento presentados en la Tabla 2c. En algunas modalidades, los dominios de reclutamiento comprenden los dominios de reclutamiento de STAT de IL7Ra e IL2Rb. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento comprende los dominios de reclutamiento de STAT de IL7Ra e IL12Rb1.

- 5** En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento comprende los dominios de reclutamiento de STAT de IL7Ra e IL12Rb2. En algunas modalidades, el CACCR comprende la secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 97 o 126, con o sin una secuencia señal. En algunas modalidades, el CACCR
- 10** comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 97 o 126, con o sin una secuencia señal.

En algunas modalidades, el CACCR de la descripción comprende el dominio transmembrana y/o el dominio de unión a JAK de un receptor TPOR/MPLR que comprende las sustituciones S505N y W515K. En algunas modalidades, el CACCR comprende además

- 15** un dominio de reclutamiento que comprende la secuencia de aminoácidos de una o más de las secuencias de receptor presentadas en la Tabla 2b. En algunas modalidades, el CACCR comprende además uno o más dominios de reclutamiento que se seleccionan del grupo que consiste en los dominios de reclutamiento de STAT de IL7Ra, IL2Rb, IL12Rb1, IL12Rb2 e IL21R. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento comprende el dominio de
- 20** reclutamiento de STAT de IL7Ra. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL7Ra comprende la secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 46, 68, 69, 70, 71 o 72. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL7Ra comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:
- 25** 46, 68, 69, 70, 71 o 72. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento comprende el dominio de reclutamiento de STAT de IL2Rb. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL2Rb comprende la secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 106 o 142. En algunas
- 30** modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL2Rb comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 106 o 142. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento comprende el dominio de reclutamiento de STAT de IL12Rb1 o IL12Rb2. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL12Rb1 o IL12Rb2 comprende la secuencia de aminoácidos que es al menos
- 35** aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67, 86 u 87. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL12Rb1 o IL12Rb2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67, 86 u 87. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento comprende el dominio de reclutamiento de STAT de IL21R. En algunas modalidades, el dominio de

- reclutamiento de STAT de IL21R comprende la secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 54. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL21R comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 54.
- 5** En algunas modalidades, el CACCR comprende uno o más dominios de reclutamiento presentados en la Tabla 2c. En algunas modalidades, los dominios de reclutamiento comprenden los dominios de reclutamiento de STAT de IL7Ra e IL2Rb. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento comprende los dominios de reclutamiento de STAT de IL7Ra e IL12Rb1. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento
- 10** comprende los dominios de reclutamiento de STAT de IL7Ra e IL12Rb2. En algunas modalidades, el CACCR comprende la secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 96, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 125, 128, 129, 132, 134, 136 o 138, con o sin una secuencia señal. En algunas modalidades, el CACCR
- 15** comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 96, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 125, 128, 129, 132, 134, 136 o 138, con o sin una secuencia señal.

- En algunas modalidades, el CACCR de la descripción comprende el dominio transmembrana y/o el dominio de unión a JAK de un receptor TPOR/MPLR que comprende las sustituciones H499L y W515K. En algunas modalidades, el CACCR comprende además
- 20** un dominio de reclutamiento que comprende la secuencia de aminoácidos de una o más de las secuencias de receptor presentadas en la Tabla 2b. En algunas modalidades, el CACCR comprende además uno o más dominios de reclutamiento que se seleccionan del grupo que consiste en los dominios de reclutamiento de STAT de IL7Ra, IL2Rb, IL12Rb1, IL12Rb2 e IL21R. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento comprende el dominio de
- 25** reclutamiento de STAT de IL7Ra. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL7Ra comprende la secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 46, 68, 69, 70, 71 o 72. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL7Ra comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:
- 30** 46, 68, 69, 70, 71 o 72. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento comprende el dominio de reclutamiento de STAT de IL2Rb. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL2Rb comprende la secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 106 o 142. En algunas
- 35** modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL2Rb comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 106 o 142. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento comprende el dominio de reclutamiento de STAT de IL12Rb1 o IL12Rb2. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL12Rb1 o IL12Rb2 comprende la secuencia de aminoácidos que es al menos

- aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67, 86 u 87. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL12Rb1 o IL12Rb2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67, 86 u 87. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento comprende
- 5** el dominio de reclutamiento de STAT de IL21R. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL21R comprende la secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 54. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL21R comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 54. En
- 10** algunas modalidades, el CACCR comprende uno o más dominios de reclutamiento presentados en la Tabla 2c. En algunas modalidades, los dominios de reclutamiento comprenden los dominios de reclutamiento de STAT de IL7Ra e IL2Rb. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento comprende los dominios de reclutamiento de STAT de IL7Ra e IL12Rb1. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento
- 15** comprende los dominios de reclutamiento de STAT de IL7Ra e IL12Rb2. En algunas modalidades, el CACCR comprende la secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 93, con o sin una secuencia señal. En algunas modalidades, el CACCR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 93, con
- 20** o sin una secuencia señal.

- En algunas modalidades, el CACCR de la descripción comprende el dominio transmembrana y/o el dominio de unión a JAK de un receptor TPOR/MPLR que comprende las sustituciones H499L, S505N y W515K. En algunas modalidades, el CACCR comprende además un dominio de reclutamiento que comprende la secuencia de aminoácidos de una
- 25** o más de las secuencias de receptor presentadas en la Tabla 2b. En algunas modalidades, el CACCR comprende además uno o más dominios de reclutamiento que se seleccionan del grupo que consiste en los dominios de reclutamiento de STAT de IL7Ra, IL2Rb, IL12Rb1, IL12Rb2 e IL21R. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento comprende el dominio de reclutamiento de STAT de IL7Ra. En algunas modalidades, el dominio de
- 30** reclutamiento de STAT de IL7Ra comprende la secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 46, 68, 69, 70, 71 o 72. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL7Ra comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 46, 68, 69, 70, 71 o 72. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento
- 35** comprende el dominio de reclutamiento de STAT de IL2Rb. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL2Rb comprende la secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 106 o 142. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL2Rb comprende la

secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 106 o 142. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento comprende el dominio de reclutamiento de STAT de IL12Rb1 o IL12Rb2. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL12Rb1 o IL12Rb2 comprende la secuencia de aminoácidos que es al menos

5 aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67, 86 u 87. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL12Rb1 o IL12Rb2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67, 86 u 87. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento comprende el dominio de reclutamiento de STAT de IL21R. En algunas modalidades, el dominio de

10 reclutamiento de STAT de IL21R comprende la secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 54. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento de STAT de IL21R comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 54. En algunas modalidades, el CACCR comprende uno o más dominios de reclutamiento

15 presentados en la Tabla 2c. En algunas modalidades, los dominios de reclutamiento comprenden los dominios de reclutamiento de STAT de IL7Ra e IL2Rb. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento comprende los dominios de reclutamiento de STAT de IL7Ra e IL12Rb1. En algunas modalidades, el dominio de reclutamiento comprende los dominios de reclutamiento de STAT de IL7Ra e IL12Rb2. En algunas

20 modalidades, el CACCR comprende la secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 95, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 124, 130, 131, 133, 135, 137, 139, 180, 181, 182, 184, 185 o 186, con o sin una secuencia señal. En algunas modalidades, la secuencia señal comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:

25 89. En algunas modalidades, el CACCR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 95, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 124, 130, 131, 133, 135, 137, 139, 180, 181, 182, 184, 185 o 186, con o sin una secuencia señal. En algunas modalidades, la secuencia señal comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 89. En algunas modalidades, el CACCR comprende un dominio de unión a ligando extracelular. En algunas modalidades, el

30 CACCR no comprende un dominio de unión a ligando extracelular. Los CACCR se describen en la solicitud copendiente núm. US2020/0291090, que se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad.

Tabla 3. Secuencias de CACCR ilustrativas

	Receptor	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
5	TPOR/MPLR(478-582).IL7Ra(316-459)	SDPTRVETATETAWISLVTALHLVLGLSAVLGLLLLR WQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPLARDE VEGFLQDTFPQQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSEDV VITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSSSRSLDCR ESGKNGPHVYQDLLLSLGTTNSTLPPPFSLQSGILT NPVAQQQPILTSLGSNQEEAYVTMSSFYQNNQ	90
10			
15	TPOR/MPLR(478-582; H499L,S505N).IL7Ra(316-459)	SDPTRVETATETAWISLVTAL <u>LL</u> VLGL <u>N</u> AVLGLLLLR WQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPLARDE VEGFLQDTFPQQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSEDV VITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSSSRSLDCR ESGKNGPHVYQDLLLSLGTTNSTLPPPFSLQSGILT NPVAQQQPILTSLGSNQEEAYVTMSSFYQNNQ	91
20	TPOR/MPLR(478-582;S505N).IL7Ra(316-459)	SDPTRVETATETAWISLVTALHLVLGL <u>N</u> AVLGLLLLR WQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPLARDE VEGFLQDTFPQQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSEDV VITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSSSRSLDCR ESGKNGPHVYQDLLLSLGTTNSTLPPPFSLQSGILT NPVAQQQPILTSLGSNQEEAYVTMSSFYQNNQ	92
25			
30	TPOR/MPLR(478-582;H499L,W515K).IL7Ra(316-459)	SDPTRVETATETAWISLVTAL <u>LL</u> VLGLSAVLGLLLLR <u>K</u> QFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPLARDE VEGFLQDTFPQQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSEDV VITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSSSRSLDCR ESGKNGPHVYQDLLLSLGTTNSTLPPPFSLQSGILT NPVAQQQPILTSLGSNQEEAYVTMSSFYQNNQ	93

	Receptor	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
5	TPOR/MPLR(478-582;W515K).IL7Ra(316-459)	SDPTRVETATETAWISLVTALHLVLGLSAVLGLLLLR <u>K</u> QFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPLARDE VEGFLQDTPPQQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSEDV VITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSSSRSLDCR ESGKNGPHVYQDLLLLSLGTTNSTLPPPFSLQSGILTL NPVAQQQPILTSLGSNQEEAYVTMSSFYQNNQ	94
10			
15	TPOR/MPLR(478-582;H499L,S505N,W515K).IL7Ra(316-459)	SDPTRVETATETAWISLVTALLLVLGLNAVLGLLLLR <u>K</u> QFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPLARDE VEGFLQDTPPQQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSEDV VITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSSSRSLDCR ESGKNGPHVYQDLLLLSLGTTNSTLPPPFSLQSGILTL NPVAQQQPILTSLGSNQEEAYVTMSSFYQNNQ	95
20	TPOR/MPLR(478-582;S505N,W515K).IL7Ra(316-459)	SDPTRVETATETAWISLVTALHLVLGLNAVLGLLLLR <u>K</u> QFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPLARDE VEGFLQDTPPQQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSEDV VITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSSSRSLDCR ESGKNGPHVYQDLLLLSLGTTNSTLPPPFSLQSGILTL NPVAQQQPILTSLGSNQEEAYVTMSSFYQNNQ	96
25			
30	TPOR/MPLR(478-582;H499L,G509N).IL7Ra(316-459)	SDPTRVETATETAWISLVTALLLVLGLSAVLNLLLLR WQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPLARDE VEGFLQDTPPQQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSEDV VITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSSSRSLDCR ESGKNGPHVYQDLLLLSLGTTNSTLPPPFSLQSGILTL NPVAQQQPILTSLGSNQEEAYVTMSSFYQNNQ	97
35	TPOR/MPLR(478-582;H499L,S505N).IL7Ra(316-459)	SDPTRVETATETAWISLVTALLLVLGLNAVLGLLLLR WQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPLARDE VEGFLQDTPPQQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSEDV VITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSSSRSLDCR	98

	Receptor	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
		ESGKNGPHVYQDLLLSLGTNSTLPPPFSLQSGILTL NPVAQQQPILTSLSNQEAYVTMSSFYQNNQ	
5	TpoR(478-582;S505N,W515K). IL2Rb(393-433,518-551)	SDPTRVETATETAWISLVTALHLVLGL <u>N</u> AVLGLLLLR <u>K</u> QFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL <u>E</u> DE GVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLL FSPSGQGGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPT HLV	99
10			
15	TpoR(478-582;H499L,S505N,W515K).IL2Rb(339-379,393-433,518-551)	SDPTRVETATETAWISLVTAL <u>L</u> VLGL <u>N</u> AVLGLLLLR <u>K</u> QFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL <u>E</u> QQ DKVPEPASLSSNHSLSCTFNQGYFFFHLPDALEIEA CQDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRD DLLLLFSPSGQGGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQQQ DPTHLV	100
20	CD8SS-TPOR/MPLR(478-582;S505N,W515K). IL12Rb2(714-862)	MALPVTALLPLALLHAARPSDPTRVETATETAWIS LVTALHLVLGL <u>N</u> AVLGLLLLR <u>K</u> QFPAHYRRLRHALW PSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVEP SLEILPKSSERTPLPLVTPVFRHPPCSNWPQREKGI QGHQASEKDMMHSASSPPPPRALQAESRQLVDLY KVLESRGSDPKPENPACPWTVLPAGDLPTHDGYLP SNIDDLPSHEAPLADSLEELEPQHISLSVFPSSSLHP LTFSCGDKLTLDQLKMRCDSLML	107
25			
30	CD8SS-TPOR/MPLR(478-582;H499L,S505N,W515K).IL12Rb2(714-862)	MALPVTALLPLALLHAARPSDPTRVETATETAWIS LVTAL <u>L</u> VLGL <u>N</u> AVLGLLLLR <u>K</u> QFPAHYRRLRHALW PSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVEP SLEILPKSSERTPLPLVTPVFRHPPCSNWPQREKGI QGHQASEKDMMHSASSPPPPRALQAESRQLVDLY KVLESRGSDPKPENPACPWTVLPAGDLPTHDGYLP SNIDDLPSHEAPLADSLEELEPQHISLSVFPSSSLHP LTFSCGDKLTLDQLKMRCDSLML	108
35	CD8SS-TPOR/MPLR(478-582;S505N,W515K).IL12Rb2(775-825)	MALPVTALLPLALLHAARPSDPTRVETATETAWIS LVTALHLVLGL <u>N</u> AVLGLLLLR <u>K</u> QFPAHYRRLRHALW PSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVEP SLEILPKSSERTPLPLSDPKPENPACPWTVLPAGDL PTHDGYLPSNIDDLPSHEAPLADSLEELEPQ	109

	Receptor	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
5	CD8SS-TPOR/MPLR(478-582;H499L,S505N,W515K).IL2Rb2(775-825)	MALPVTALLLPLALLLHAARPSDPTRVETATETAWIS LVTALLLVLGLNAVLGLLLLLRKQFPAHYRRLRHALW PSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVEP SLLEILPKSSERTPLPLSDPKPENPACPWTVLPAGDL PTHDGYLPSNIDDLPSHEAPLADSLEELEPQ	110
10	CD8SS-TPOR/MPLR(478-582;S505N,W515K).IL2Rb(333-551)	MALPVTALLLPLALLLHAARPSDPTRVETATETAWIS LVTALHLVLGLNAVLGLLLLLRKQFPAHYRRLRHALW PSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVEP SLLEILPKSSERTPLPLVTQLLLQQDKVPEPASLSSN HSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYS EEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPS RDDLLLFSPSLLGGPSPSTAPGGSGAGEERMPPS LQERVPRDWDQPPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELV REAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNA RLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV	111
15			
20	CD8SS-TPOR/MPLR(478-582;H499L,S505N,W515K).IL2Rb(333-551)	MALPVTALLLPLALLLHAARPSDPTRVETATETAWIS LVTALLLVLGLNAVLGLLLLLRKQFPAHYRRLRHALW PSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVEP SLLEILPKSSERTPLPLVTQLLLQQDKVPEPASLSSN HSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYS EEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPS RDDLLLFSPSLLGGPSPSTAPGGSGAGEERMPPS LQERVPRDWDQPPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELV REAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNA RLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV	112
25			
30	CD8SS-TPOR/MPLR(478-582;S505N,W515K).IL2Rb(393-433,518-551)	MALPVTALLLPLALLLHAARPSDPTRVETATETAWIS LVTALHLVLGLNAVLGLLLLLRKQFPAHYRRLRHALW PSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVEP SLLEILPKSSERTPLPLDEGVAGAPTGSSPQPLQPLS GEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSGQGEFRALNARLPLN TDAYLSLQELQGQDPTHLV	113
35	CD8SS-TPOR/MPLR(478-582;H499L,S505N,	MALPVTALLLPLALLLHAARPSDPTRVETATETAWIS LVTALLLVLGLNAVLGLLLLLRKQFPAHYRRLRHALW PSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVEP SLLEILPKSSERTPLPLDEGVAGAPTGSSPQPLQPLS	114

	Receptor	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
5	W515K).IL2Rb(393-433,518-551)	GEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSGQGEFRALNARLPLN TDAYLSLQELQGQDPHTLV	
10	CD8SS-TPOR/MPLR(478-582;S505N,W515K).IL2Rb(339-379,393-433,518-551)	MALPVTALLLPLALLLHAARPSDPTRVETATETAWIS LVTALHLVLGL <u>N</u> AVLGLLLLR <u>K</u> QFPAHYRRLRHALW PSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVEP SLLEILPKSSERTPLPLQQDKVPEPASLSSNHS�TSC FTNQGYFFFHLPDALEIEACQDEGVAGAPTGSSPQP LQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSGQGEFRALNA RLPLNTDAYLSLQELQGQDPHTLV	115
15	CD8SS-TPOR/MPLR(478-582;H499L,S505N,W515K).IL2Rb(339-379,393-433,518-551)	MALPVTALLLPLALLLHAARPSDPTRVETATETAWIS LVTAL <u>L</u> VLGL <u>N</u> AVLGLLLLR <u>K</u> QFPAHYRRLRHALW PSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVEP SLLEILPKSSERTPLPLQQDKVPEPASLSSNHS�TSC FTNQGYFFFHLPDALEIEACQDEGVAGAPTGSSPQP LQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSGQGEFRALNA RLPLNTDAYLSLQELQGQDPHTLV	116
20	CD8SS-TPOR/MPLR(478-582;S505N,W515K).IL7Ra(316-459).IL12Rb2(775-825)	MALPVTALLLPLALLLHAARPSDPTRVETATETAWIS LVTALHLVLGL <u>N</u> AVLGLLLLR <u>K</u> QFPAHYRRLRHALW PSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVEP SLLEILPKSSERTPLPLARDEVEGFLQDTFPQQLEES EKQRLGGDVQSPNCPSQEDVVITPESFGRDSSLTCLA GNVSACDAPILSSSRSLDCRESGKNGPHVYQDLLLLS LGTNSTLPPPFSLQSGILTLNPVAQQQPILTS�GSN QEEAYVTMSSFYQNSDPKPENPACPWTVLPAGDL PTHDGYLPSNIDDLPSHEAPLADSLEELEPQ	117
25			
30	CD8SS-TPOR/MPLR(478-582;H499L,S505N,W515K).IL7Ra(316-459).IL12Rb2(775-825)	MALPVTALLLPLALLLHAARPSDPTRVETATETAWIS LVTAL <u>L</u> VLGL <u>N</u> AVLGLLLLR <u>K</u> QFPAHYRRLRHALW PSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVEP SLLEILPKSSERTPLPLARDEVEGFLQDTFPQQLEES EKQRLGGDVQSPNCPSQEDVVITPESFGRDSSLTCLA GNVSACDAPILSSSRSLDCRESGKNGPHVYQDLLLLS LGTNSTLPPPFSLQSGILTLNPVAQQQPILTS�GSN QEEAYVTMSSFYQNSDPKPENPACPWTVLPAGDL PTHDGYLPSNIDDLPSHEAPLADSLEELEPQ	118
35			

	Receptor	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
5	TPOR/MPLR(478-582).IL7Ra(316-459)	SDPTRVETATETAWISLVTALHLVLGLSAVLGLLLLLR WQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPLLEAR DEVEGFLQDTFPQQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSE DVVITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSSSRSLD CRESGKNGPHVYQDLLLLSLGTTNSTLPPPFSLQSGI LTLNPVAQGQPILTSLSNQEEAYVTMSSFYQNNQ	119
10	TPOR/MPLR(478-582; H499L,S505N).IL7Ra(316-459)	SDPTRVETATETAWISLVTALLLVLGLNAVLGLLLLLR WQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPLLEAR DEVEGFLQDTFPQQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSE DVVITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSSSRSLD CRESGKNGPHVYQDLLLLSLGTTNSTLPPPFSLQSGI LTLNPVAQGQPILTSLSNQEEAYVTMSSFYQNNQ	120
15			
20	TPOR/MPLR(478-582;S505N).IL7Ra(316-459)	SDPTRVETATETAWISLVTALHLVLGLNAVLGLLLLLR WQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPLLEAR DEVEGFLQDTFPQQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSE DVVITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSSSRSLD CRESGKNGPHVYQDLLLLSLGTTNSTLPPPFSLQSGI LTLNPVAQGQPILTSLSNQEEAYVTMSSFYQNNQ	121
25	TPOR/MPLR(478-582;H499L,W515K).IL7Ra(316-459)	SDPTRVETATETAWISLVTALLLVLGLSAVLGLLLLLR KQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPLLEAR DEVEGFLQDTFPQQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSE DVVITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSSSRSLD CRESGKNGPHVYQDLLLLSLGTTNSTLPPPFSLQSGI LTLNPVAQGQPILTSLSNQEEAYVTMSSFYQNNQ	122
30			
35	TPOR/MPLR(478-582;W515K).IL7Ra(316-459)	SDPTRVETATETAWISLVTALHLVLGLSAVLGLLLLLR KQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPLLEAR DEVEGFLQDTFPQQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSE DVVITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSSSRSLD CRESGKNGPHVYQDLLLLSLGTTNSTLPPPFSLQSGI LTLNPVAQGQPILTSLSNQEEAYVTMSSFYQNNQ	123

	Receptor	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
5	TPOR/MPLR(478-582;H499L,S505N,W515K).IL7Ra(316-459)	SDPTRVETATETAWISLVTALLLVLGLNAVLGLLLLLR KQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPLLEAR DEVEGFLQDTFPQQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSE DVVITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSSSRSLD CRESGKNGPHVYQDLLLLSLGTTNSTLPPPFSLQSGI LTLNPVAQGQPILTSLSNQEEAYVTMSSFYQNNQ	124
10	TPOR/MPLR(478-582;S505N,W515K).IL7Ra(316-459)	SDPTRVETATETAWISLVTALHLVLGLNAVLGLLLLLR KQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPLLEAR DEVEGFLQDTFPQQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSE DVVITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSSSRSLD CRESGKNGPHVYQDLLLLSLGTTNSTLPPPFSLQSGI LTLNPVAQGQPILTSLSNQEEAYVTMSSFYQNNQ	125
15	TPOR/MPLR(478-582;H499L,G509N).IL7Ra(316-459)	SDPTRVETATETAWISLVTALLLVLGLSAVLNLLLLLR WQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPLLEAR DEVEGFLQDTFPQQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSE DVVITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSSSRSLD CRESGKNGPHVYQDLLLLSLGTTNSTLPPPFSLQSGI LTLNPVAQGQPILTSLSNQEEAYVTMSSFYQNNQ	126
20	TPOR/MPLR(478-582;H499L,S505N).IL7Ra(316-459)	SDPTRVETATETAWISLVTALLLVLGLNAVLGLLLLLR WQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPLLEAR DEVEGFLQDTFPQQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSE DVVITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSSSRSLD CRESGKNGPHVYQDLLLLSLGTTNSTLPPPFSLQSGI LTLNPVAQGQPILTSLSNQEEAYVTMSSFYQNNQ	127
25	TPOR/MPLR(478-582;H499L,S505N).IL7Ra(316-459)	SDPTRVETATETAWISLVTALHLVLGLNAVLGLLLLLR KQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPLLEVT QLLLQQDKVPEPASLSSNHSLSCTFNQGYFFFHLP DALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQ PLQPLSGEDDAYCTFSPSRDLLLLFSPSLLGGPSPPS TAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDQPPLGPPT PGVPDLVDFQPPPELVREAGEEVPDAGPREGVSF	128
30	TPOR/MPLR(478-582;S505N,W515K).IL2Rb(333-551)	SDPTRVETATETAWISLVTALHLVLGLNAVLGLLLLLR KQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPLLEVT QLLLQQDKVPEPASLSSNHSLSCTFNQGYFFFHLP DALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQ PLQPLSGEDDAYCTFSPSRDLLLLFSPSLLGGPSPPS TAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDQPPLGPPT PGVPDLVDFQPPPELVREAGEEVPDAGPREGVSF	
35			

	Receptor	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
		PWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQD PTHLV	
5	TPOR/MPLR(478-582;S505N,W515K).IL12Rb2(714-862)	SDPTRVETATETAWISLVTALHLVLGL <u>N</u> AVLGLLLLR <u>K</u> QFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL <u>E</u> VT PVFRHPPCSNWPQREKGIQGHQASEKDMMHSASS PPPPRALQAESRQLVDLYKVLESRGSDPKPENPAC PWTVLPAGDLPTHGDLPSNIDDLPSHEAPLADSLE ELEPQHISLSVFPSSSLHPLTFSCGDKLTLDQLKMRC DSLML	129
10			
15	TPOR/MPLR(478-582;H499L,S505N,W515K).IL2Rb(333-551)	SDPTRVETATETAWISLVTAL <u>L</u> VLGL <u>N</u> AVLGLLLLR <u>K</u> QFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL <u>E</u> VT QLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLP DALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQ PLQPLSGEDDAYCTFSPSRDDLLLFSPSLLGGSPSPS TAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDPPQPLGPPT PGVPDLVDFQPPPELVLRAGEEVPDAGPREGVSF PWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQD PTHLV	130
20			
25	TPOR/MPLR(478-582;H499L,S505N,W515K).IL12Rb2(714-862)	SDPTRVETATETAWISLVTAL <u>L</u> VLGL <u>N</u> AVLGLLLLR <u>K</u> QFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL <u>E</u> VT PVFRHPPCSNWPQREKGIQGHQASEKDMMHSASS PPPPRALQAESRQLVDLYKVLESRGSDPKPENPAC PWTVLPAGDLPTHGDLPSNIDDLPSHEAPLADSLE ELEPQHISLSVFPSSSLHPLTFSCGDKLTLDQLKMRC DSLML	131
30			
35	TPOR/MPLR(478-582;S505N,W515K).IL12Rb2(775-825)	SDPTRVETATETAWISLVTALHLVLGL <u>N</u> AVLGLLLLR <u>K</u> QFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL <u>E</u> SD PKPENPACPWTVLPAGDLPTHGDLPSNIDDLPSHE APLADSLEELEPQ	132
	TPOR/MPLR(478-582;H499L;S505N,	SDPTRVETATETAWISLVTAL <u>L</u> VLGL <u>N</u> AVLGLLLLR <u>K</u> QFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL <u>E</u> SD	133

	Receptor	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
5	W515K).IL12Rb2(775-825)	PKPENPACPWTVLPAGDLPTHDGYLPSNIDDLPSHE APLADSLEELEPQ	
10	TPOR/MPLR(478-582;S505N,W515K).IL7Ra(316-459).IL12Rb2(775-825)	SDPTRVETATETAWISLVTALHLVLGL <u>N</u> AVLGLLLLR <u>K</u> QFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL <u>E</u> EAR DEVEGFLQDTFPQQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSE DVVITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSSSRSLD CRESGKNGPHVYQDLLLLSLGTTNSTLPPPFSLQSGI LTLNPVAQGQPILTSLGSNQEEAYVTMSSFYQNQSR SDPKPENPACPWTVLPAGDLPTHDGYLPSNIDDLPS HEAPLADSLEELEPQ	134
15	TPOR/MPLR(478-582;H499L,S505N,W515K).IL7Ra(316-459).IL12Rb2(775-825)	SDPTRVETATETAWISLVTAL <u>L</u> VLGL <u>N</u> AVLGLLLLR <u>K</u> QFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL <u>E</u> EAR DEVEGFLQDTFPQQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSE DVVITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSSSRSLD CRESGKNGPHVYQDLLLLSLGTTNSTLPPPFSLQSGI LTLNPVAQGQPILTSLGSNQEEAYVTMSSFYQNQSR SDPKPENPACPWTVLPAGDLPTHDGYLPSNIDDLPS HEAPLADSLEELEPQ	135
20	TPOR/MPLR(478-582;S505N,W515K).IL2Rb(333-551;Y381S,Y384S,Y387S)	SDPTRVETATETAWISLVTALHLVLGL <u>N</u> AVLGLLLLR <u>K</u> QFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL <u>E</u> VT QLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLP DALEIEACQV <u>S</u> FT <u>S</u> DP <u>S</u> SEEDPDEGVAGAPTGSSSPQ PLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPS TAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDQPPLGPPT PGVPDLVDFQPPPELVREAGEEVPDAGPREGVSF PWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQD PTHLV	136
25	TPOR/MPLR(478-582;H499L,S505N,W515K).IL2Rb(333-551;Y381S,Y384S,Y387S)	SDPTRVETATETAWISLVTAL <u>L</u> VLGL <u>N</u> AVLGLLLLR <u>K</u> QFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL <u>E</u> VT QLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLP DALEIEACQV <u>S</u> FT <u>S</u> DP <u>S</u> SEEDPDEGVAGAPTGSSSPQ	137
30	TPOR/MPLR(478-582;H499L,S505N,W515K).IL2Rb(333-551;Y381S,Y384S,Y387S)	SDPTRVETATETAWISLVTALHLVLGL <u>N</u> AVLGLLLLR <u>K</u> QFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL <u>E</u> VT QLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLP DALEIEACQV <u>S</u> FT <u>S</u> DP <u>S</u> SEEDPDEGVAGAPTGSSSPQ	
35	TPOR/MPLR(478-582;H499L,S505N,W515K).IL2Rb(333-551;Y381S,Y384S,Y387S)	SDPTRVETATETAWISLVTALHLVLGL <u>N</u> AVLGLLLLR <u>K</u> QFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL <u>E</u> VT QLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLP DALEIEACQV <u>S</u> FT <u>S</u> DP <u>S</u> SEEDPDEGVAGAPTGSSSPQ	

	Receptor	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
5	551;Y381S,Y384S,Y387S)	PLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPS TAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDQPPLGPPT PGVPDLVDFQPPPELVLEAGEEVPDAGPREGVSF PWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQD PTHLV	
10	TPOR/MPLR(478-582;S505N,W515K).IL2Rb(333-551;Y364S,Y381S,Y384S,Y387S)	SDPTRVETATETAWISLVTALHLVLGL <u>N</u> AVLGLLLLR <u>K</u> QFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL <u>L</u> EV QLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGS <u>S</u> FFFHLP DALEIEACQV <u>S</u> FT <u>S</u> DP <u>S</u> SEEDPDEGVAGAPTGSSPQ PLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPS TAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDQPPLGPPT PGVPDLVDFQPPPELVLEAGEEVPDAGPREGVSF PWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQD PTHLV	138
15			
20	TpoR/MPLR(478-582;H499L,S505N,W515K).IL2Rb(333-551;Y364S,Y381S,Y384S,Y387S)	SDPTRVETATETAWISLVTAL <u>L</u> VLGL <u>N</u> AVLGLLLLR <u>K</u> QFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL <u>L</u> EV QLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGS <u>S</u> FFFHLP DALEIEACQV <u>S</u> FT <u>S</u> DP <u>S</u> SEEDPDEGVAGAPTGSSPQ PLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPS TAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDQPPLGPPT PGVPDLVDFQPPPELVLEAGEEVPDAGPREGVSF PWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQD PTHLV	139
25			
30	TpoR(478-582;H499L,S505N,W515K).IL2Rb(393-433,518-551)	SDPTRVETATETAWISLVTAL <u>L</u> VLGL <u>N</u> AVLGLLLLR <u>K</u> QFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPL <u>L</u> EDE GVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLL FSPSGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPT HLV	143
35	TpoR(478-582;S505N,W515K).IL2Rb(393-433,518-551)	SDPTRVETATETAWISLVTALHLVLGL <u>N</u> AVLGLLLLR <u>K</u> QFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPLDEGV AGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSP SGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV	180

	Receptor	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
5	TpoR(478-582;H499L,S505N,W515K).IL2Rb(339-379,393-433,518-551)	SDPTRVETATETAWISLVTALLLVLGLNAVLGLLLLR KQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPLQQDK VPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEAC QDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDD LLLFSPSGQGGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQD PTHLV	181
10	TpoR(478-582;H499L,S505N,W515K).IL2Rb(393-433,518-551)	SDPTRVETATETAWISLVTALLLVLGLNAVLGLLLLR KQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPLDEGV AGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSP SGQGGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV	182
15	TpoR(478-582;S505N,W515K).IL2Rb(393-433,518-551).P2A	SDPTRVETATETAWISLVTALHLVLGLNAVLGLLLLR KQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPLLEDE GVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLL FSPSGQGGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPT HLVGSGATNFSLLKQAGDVEENPG	184
20	TpoR(478-582;H499L,S505N,W515K).IL2Rb(339-379,393-433,518-551).P2A	SDPTRVETATETAWISLVTALLLVLGLNAVLGLLLLR KQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPLLEQQ DKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEA CQDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRD DLLLLFSPSGQGGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQ DPTHLVGSGATNFSLLKQAGDVEENPG	185
25	TpoR(478-582;H499L,S505N,W515K).IL2Rb(393-433,518-551).P2A	SDPTRVETATETAWISLVTALLLVLGLNAVLGLLLLR KQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPLLEDE GVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLL FSPSGQGGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPT HLVGSGATNFSLLKQAGDVEENPG	186
30	TpoR(478-582;H499L,S505N,W515K).IL2Rb(393-433,518-551).P2A	SDPTRVETATETAWISLVTALLLVLGLNAVLGLLLLR KQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAAL SPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPLLEDE GVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLL FSPSGQGGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPT HLVGSGATNFSLLKQAGDVEENPG	186

35 *Los LE y SR subrayados son enlazadores opcionales ilustrativos que pueden insertarse entre dos dominios.

E. Expresión de los CACCR

En la presente se proporcionan los polinucleótidos que codifican cualquiera de los CACCR proporcionados en la presente descripción. Asimismo, en la presente descripción se

- proporcionan los vectores de expresión que comprenden dichos polinucleótidos. En algunas modalidades, el vector es un vector viral. En algunas modalidades, el vector no es un vector viral. En algunas modalidades, el vector comprende un vector lentiviral. En algunas modalidades, el vector de expresión comprende un promotor, que puede seleccionarse entre los conocidos en la técnica. Un promotor ilustrativo que puede usarse en la invención es el promotor del factor de elongación humano 1 alfa (EF-1 alfa o EF-1 α), que puede usarse en su forma de longitud completa, o formas truncadas, u otras formas de variantes (como se describe en la literatura y se describe en, por ejemplo, Wakabayashi-Ito, N. y otros, J. Biol. Chem. 1994:269(47): 29831-29837; Montiel-Equihua, C. A. y otros, Mol. Therapy, 2012, 20(7): 1400-1409). Cualquier versión del promotor de EF1 alfa es adecuada y puede usarse como promotor único o junto con otros elementos promotores. En algunas modalidades, el vector de expresión es un vector lentiviral y el promotor es un promotor de EF-1 alfa de longitud completa. A continuación, se muestra el promotor ilustrativo de EF1 alfa de longitud completa:
- 5** los conocidos en la técnica. Un promotor ilustrativo que puede usarse en la invención es el promotor del factor de elongación humano 1 alfa (EF-1 alfa o EF-1 α), que puede usarse en su forma de longitud completa, o formas truncadas, u otras formas de variantes (como se describe en la literatura y se describe en, por ejemplo, Wakabayashi-Ito, N. y otros, J. Biol. Chem. 1994:269(47): 29831-29837; Montiel-Equihua, C. A. y otros, Mol. Therapy, 2012, 20(7): 1400-1409). Cualquier versión del promotor de EF1 alfa es adecuada y puede usarse como promotor único o junto con otros elementos promotores. En algunas modalidades, el vector de expresión es un vector lentiviral y el promotor es un promotor de EF-1 alfa de longitud completa. A continuación, se muestra el promotor ilustrativo de EF1 alfa de longitud completa:
- 10** 20(7): 1400-1409). Cualquier versión del promotor de EF1 alfa es adecuada y puede usarse como promotor único o junto con otros elementos promotores. En algunas modalidades, el vector de expresión es un vector lentiviral y el promotor es un promotor de EF-1 alfa de longitud completa. A continuación, se muestra el promotor ilustrativo de EF1 alfa de longitud completa:
- 15** GCGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGA
GAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGG
GTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGA
GAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCG
CCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTT
20 ATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACGCCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTG
ATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAG
CCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCGCGTG
CGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTT
AAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCG
25 GGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGTTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGC
CCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCG
AGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGC
GCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTGCGCACCAAGTTG
CGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGG
30 ACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTT
TCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCA
CCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTT
TATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGG
CACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTC
35 AAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTTCAGGTGTCGTGA (SEQ ID
NO: 187)

A continuación, se muestra el promotor ilustrativo de EF1 alfa corto:
GCGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGA
GAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGG

GTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTAAGTGGCTCCGCCTTTTCCCGAGGGTGGGGGA
 GAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCG
 CCAGAACACAG (SEQ ID NO: 188)

En algunas modalidades, el vector de expresión comprende un polinucleótido que
 5 expresa un CACCR y un polinucleótido que expresa un receptor quimérico de antígeno
 (CAR).

En algunas modalidades, el CACCR y el CAR se expresan como una sola cadena
 polipeptídica, separada por un enlazador. La Figura 2B, Figura 2C y Figura 2D muestran los
 esquemas de los vectores que pueden usarse para coexpresar el CACCR y un CAR de
 10 BCMA de la descripción. Pueden unirse uno o más dominios de reclutamiento en tándem en
 el CACCR para imitar la señalización de una o más citocinas.

II. Células inmunitarias que tienen CAR

En la presente descripción se proporcionan las células inmunitarias modificadas por
 ingeniería genética que comprenden un polinucleótido que codifica un receptor quimérico de
 15 antígeno (CAR) del antígeno de maduración de células B (BCMA) y un CACCR de la
 descripción; y en la presente descripción se proporcionan las células inmunitarias
 modificadas por ingeniería genética que expresan un receptor quimérico de antígeno de
 BCMA (célula T con CAR de BCMA) y un CACCR de la descripción. Los ejemplos de las
 células inmunitarias incluyen las células T, por ejemplo, las células T alfa/beta y las células
 20 T gamma/delta, las células B, las células asesinas naturales (NK), las células T asesinas
 naturales (NKT), las células NKT invariantes, los mastocitos, los fagocitos derivados de
 mieloides, las células dendríticas, las células dendríticas asesinas, los macrófagos y los
 monocitos. En algunas modalidades, las células inmunitarias modificadas por ingeniería
 genética son células T CD4+ y/o CD8+. En algunas modalidades, las células inmunitarias
 25 modificadas por ingeniería genética son células T que ejercen una o más funciones efectoras
 de células T (o células T efectoras). Las células inmunitarias también se refieren a las células
 derivadas de, por ejemplo, sin limitación, una célula madre. Las células madre pueden ser
 células madre de adulto, células madre embrionarias no humanas, más en particular células
 madre no humanas, células madre de cordón umbilical, células progenitoras, células madre
 30 de médula ósea, células madre pluripotentes inducidas, células madre totipotentes o células
 madre hematopoyéticas. Las células inmunitarias pueden obtenerse de una fuente natural,
 tal como de un paciente humano o pueden prepararse, por ejemplo, a partir de células de
 donantes, células madre o células no madre, de acuerdo con los métodos conocidos en la
 técnica.

En consecuencia, en algunas modalidades, en la presente descripción se
 proporcionan las células T con CAR de BCMA que comprenden un CACCR de la
 descripción.

En algunas modalidades, un CAR de BCMA puede comprender un dominio de unión
 a ligando extracelular (por ejemplo, un fragmento variable de cadena sencilla (scFv)), un

dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular. En algunas modalidades, el dominio de unión a ligando extracelular, el dominio transmembrana y el dominio de señalización intracelular están en un polipéptido, es decir, en una sola cadena. En la presente descripción también se proporcionan los CAR de BCMA de múltiples cadenas y los polipéptidos. En algunas modalidades, los CAR de BCMA de múltiples cadenas comprenden: un primer polipéptido que comprende un dominio transmembrana y al menos un dominio de unión a ligando extracelular, y un segundo polipéptido que comprende un dominio transmembrana y al menos un dominio de señalización intracelular, en donde los polipéptidos se ensamblan para formar un CAR de múltiples cadenas.

El dominio de unión al ligando extracelular de un CAR de BCMA se une específicamente a BCMA.

En algunas modalidades, el dominio de unión al ligando extracelular de un CAR de BCMA comprende un scFv que comprende la región variable de la cadena ligera (VL) y la región variable de la cadena pesada (VH) de un anticuerpo monoclonal específico a BCMA unido por un enlazador flexible. Los fragmentos de la región variable de cadena sencilla se preparan por la unión de las regiones variables de la cadena ligera y/o pesada mediante el uso de un péptido de enlace corto (Bird y otros, Science 242:423-426, 1988) (por ejemplo, enlazadores que contienen glicina-serina). En general, los enlazadores pueden ser polipéptidos cortos, flexibles y están compuestos generalmente por aproximadamente 20 residuos de aminoácidos o menos. Los enlazadores a su vez pueden modificarse para funciones adicionales, tales como la unión de fármacos o la unión a soportes sólidos. Las variantes de cadena sencilla pueden producirse de forma recombinante o por síntesis. Para la producción por síntesis de scFv, puede usarse un sintetizador automático. Para la producción recombinante de scFv, un plásmido adecuado que contiene un polinucleótido que codifica el scFv puede introducirse en una célula huésped adecuada, ya sea eucariota, tal como las células de levadura, plantas, insectos o mamíferos, o procariota, tal como *E. coli*. Los polinucleótidos que codifican el scFv de interés pueden producirse mediante manipulaciones habituales tales como la ligadura de polinucleótidos. El scFv resultante puede aislarse mediante el uso de técnicas estándar de purificación de proteínas conocidas en la técnica.

El dominio de señalización intracelular de un CAR de BCMA de acuerdo con la invención es responsable de la señalización intracelular después de la unión del dominio de unión al ligando extracelular al objetivo lo que da como resultado la activación de la célula inmunitaria y la respuesta inmunitaria (señales 1 y/o 2). El dominio de señalización intracelular tiene la capacidad de activar al menos una de las funciones efectoras normales de la célula inmunitaria en la que se expresa el CAR. Por ejemplo, la función efectora de una célula T puede ser una actividad citolítica o actividad colaboradora, que incluye la secreción de citocinas.

- En algunas modalidades, un dominio de señalización intracelular para su uso en un CAR de BCMA puede ser las secuencias citoplasmáticas de, por ejemplo, sin limitación, el receptor de células T y los correceptores que actúan de manera simultánea para iniciar la transducción de señales después del acoplamiento del receptor de antígeno, así como
- 5 también cualquier derivado o variante de estas secuencias y cualquier secuencia sintética que tiene la misma capacidad funcional. Los dominios de señalización intracelular comprenden dos clases distintas de secuencias de señalización citoplasmáticas: las que inician la activación primaria dependiente del antígeno y las que actúan de forma independiente del antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora. Las
- 10 secuencias de señalización citoplasmáticas primarias pueden comprender motivos de señalización que se conocen como motivos de activación de inmunorreceptor basado en tirosina o "ITAM". Los ITAM son motivos de señalización bien definidos que se encuentran en la cola intracitoplasmática de una variedad de receptores que sirven como sitios de unión para las tirosina quinasas de clase syk/zap70. Los ejemplos de ITAM usados en la invención
- 15 pueden incluir como ejemplos no limitantes los derivados de TCR ζ , FcR γ , FcR β , FcR ϵ , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD5, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. En algunas modalidades, el dominio de señalización intracelular del CAR de BCMA puede comprender el dominio de señalización de CD3 ζ . En algunas modalidades, el dominio de señalización intracelular del CAR de BCMA de la invención comprende un dominio de una molécula coestimuladora.
- 20 En algunas modalidades, el dominio de señalización intracelular de un CAR de BCMA de la invención comprende una parte de la molécula coestimuladora que se selecciona del grupo que consiste en un fragmento de 4-1BB (GenBank: AAA53133.) y CD28 (NP_006130.1).
- Los CAR se expresan en la membrana superficial de la célula. Por tanto, el CAR de
- 25 BCMA comprende un dominio transmembrana. Los dominios transmembrana adecuados para un CAR de BCMA descritos en la presente descripción tienen la capacidad de (a) expresarse en la superficie de una célula, preferentemente una célula inmunitaria como, por ejemplo, sin limitación, las células linfocitarias o las células asesinas naturales (NK), e (b) interactúan con el dominio de unión al ligando y el dominio de señalización intracelular para
- 30 dirigir la respuesta celular de la célula inmunitaria contra una célula objetivo predefinida. El dominio transmembrana puede derivarse de una fuente natural o sintética. El dominio transmembrana puede derivarse de cualquier proteína transmembrana o unida a la membrana. Como ejemplos no limitativos, el polipéptido transmembrana puede ser una subunidad del receptor de células T, tal como α , β , γ o δ , un polipéptido que constituye el
- 35 complejo de CD3, p55 del receptor de IL-2 (cadena α), p75 (cadena β) o cadena γ , cadena de subunidades de los receptores de Fc, en particular receptor Fc γ III o proteínas CD. Alternativamente, el dominio transmembrana puede ser sintético y puede comprender predominantemente residuos hidrófobos, tales como leucina y valina. En algunas

modalidades, dicho dominio transmembrana deriva de la cadena de CD8 α humano (por ejemplo, NP_001139345.1).

El dominio transmembrana del CAR de BCMA puede comprender además un dominio de tallo entre el dominio de unión al ligando extracelular y dicho dominio transmembrana. Un dominio de tallo puede comprender hasta 300 aminoácidos, preferentemente de 10 a 100 aminoácidos y con mayor preferencia de 25 a 50 aminoácidos. La región de tallo puede derivarse de la totalidad o parte de las moléculas de origen natural, tales como de la totalidad o parte de la región extracelular de CD8, CD4 o CD28, o de la totalidad o parte de una región constante del anticuerpo. Alternativamente, el dominio de tallo puede ser una secuencia sintética que corresponde a una secuencia de tallo de origen natural o puede ser una secuencia de tallo completamente sintética. En algunas modalidades, dicho dominio de tallo es parte de la cadena de CD8 α humano (por ejemplo, NP_001139345.1).

En otra modalidad particular, dichos dominios transmembrana y de bisagra del CAR de BCMA comprenden una parte de la cadena de CD8 α humano.

La Tabla 4 proporciona las secuencias ilustrativas de los componentes de CAR que pueden usarse en los CAR de BCMA descritos en la presente descripción y las secuencias de CAR y/o anticuerpo ejemplificadas en la presente descripción.

Tabla 4: Secuencias de aminoácidos relacionadas con los CAR de BCMA

	Dominio	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
20	Regiones de bisagra y transmembrana de CD8	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	101
25	Señalización intracelular de 4-1BB	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE GGCEL	102
30	Señalización intracelular de CD3z	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY SEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPR	103
35	BFP	MSELIKENMHMKLYMEGTVDNHHFKCTSEGEKPYE GTQTMRIKVVEGGPLPFAFDILATSFLYGSKTFINHTQ GIPDFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQ DGCLIYNVKIRGVNFTSNGPVMQKKT LGWEAFTETLY PADGGLEGRNDMALKLVGGSHLIANIKTTYRSKPAK	104

	Dominio	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
		NLKMPGVYYVDYRLERIKEANNETYVEQHEVAVARYC DLPSKLGHKLN	
5	P2A	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	105
10	scFv anti-BCMA de P5A2	EVQLLES G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M N W V R Q A P G K G L E W V S A I S D S G G S T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R Y W P M D I W G Q G T L V T V S S G G G G S G G G G S G G G G S E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L M Y D A S I R A T G I P D R F S G S G S G T D F T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q Q Y G S W P L T F G Q G T K V E I K	140
15	anti-CAR de BCMA de P5A2 [incluido el interruptor de seguridad, los paréntesis indican la secuencia señal]	(MALPVTALLPLALLHAARP)EVQLLE S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M N W V R Q A P G K G L E W V S A I S D S G G S T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R Y W P M D I W G Q G T L V T V S S G G G G S G G G G S G G G G S E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L M Y D A S I R A T G I P D R F S G S G S G T D F T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q Q Y G S W P L T F G Q G T K V E I K S G G G G S C P Y S N P S L C S G G G G S C P Y S N P S L C S G G G G S T T T P A P R P P T P A P T I A S Q P L S L R P E A C R P A A G G A V H T R G L D F A C D I Y I W A P L A G T C G V L L L S L V I T L Y C K R G R K K L L Y I F K Q P F M R P V Q T T Q E E D G C S C R F P E E E E G G C E L R V K F S R S A D A P A Y Q Q G Q N Q L Y N E L N L G R R E E Y D V L D K R R G R D P E M G G K P R R K N P Q E G L Y N E L Q K D K M A E A Y S E I G M K G E R R R G K G H D G L Y Q G L S T A T K D T Y D A L H M Q A L P P R	141
20			
25			
30			
35	VH de P5A2	EVQLLES G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M N W V R Q A P G K G L E W V S A I S D S G G S T Y Y A D S V K G R F T I S R D	144

	Dominio	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
5		NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMDIWGQGT LVTVSS	
	VL de P5A2	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWY QQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQYGSWPLTFGQGKVEIK	145
	VH CDR1 (Kabat)	SYAMN	146
10	VH CDR1 (Chothia);	GFTFSSY	147
	VH CDR1 (extendido)	GFTFSSYAMN	148
	VH CDR2 (Chothia)	AISDSGGSTYYADSVKG	149
15	VH CDR2 (Kabat)	SDSGGS	150
	VH CDR3	YWPMDI	151
	VL CDR1	RASQSVSSSYLA	152
20	VL CDR2	DASIRAT	153
	VL CDR3	QQYGSWPLT	154
	VH de C29	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMSW VRQAPGKGLEWVSAIGGSGGSLPYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMDIWGQGT LVTVSS	155
25	VL de C29	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWY QQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQYQSWPLTFGQGKVEIK	156
	VH CDR1 (Kabat)	SYPMS	157
	VH CDR1 (Chothia);	GFTFSSY	158
30	VH CDR1 (extendido)	GFTFSSYPMS	159
	VH CDR2 (Chothia)	AIGGSGGSLPYADSVKG	160
	VH CDR2 (Kabat)	GGSGGS	161
35	VH CDR3	YWPMDI	162
	VL CDR1	RASQSVSSSYLA	163
	VL CDR2	DASIRAT	164
	VL CDR3	QQYQSWPLT	165

	Dominio	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
5	CAR de BCMA de P5A2 sin secuencia señal	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNW VRQAPGKGLEWVSAISDSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMDIWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSP GERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLMYD ASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQYGSWPLTFGQGTKVEIKSGGGGSCPYSNPSLCS GGGGSCPYSNPSLCSGGGGSTTTPAPRPPTPAPTIAS QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAG TCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQ EEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQ NQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKN PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGDGL YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	166
10			
15			
	Enlazador	GGGGSGGGGSGGGGS	167
	Interruptor de apagado ("R2")	GSGGGGSCPYSNPSLCSGGGGSCPYSNPSLCSGGG GS	168
20	Bisagra de CD8	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACD	169
	TM de CD8	IYWAPLAGTCGVLLLSLVIT	170
25	mimotopo de rituximab	CPYSNPSLC	183

En algunas modalidades del CAR de BCMA, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización de CD3ζ. En algunas modalidades del CAR de BCMA, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización de CD3ζ y adicionalmente un segundo dominio de señalización. En algunas modalidades del CAR de BCMA, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización de CD3ζ y un dominio de señalización de 4-1BB. En algunas modalidades, los CAR de BCMA descritos en la presente descripción comprenden un dominio de unión a ligando extracelular que se une específicamente a BCMA, dominios de bisagra y transmembrana de CD8α humano, el dominio de señalización de CD3ζ y el dominio de señalización de 4-1BB. En algunas modalidades, el CAR específico a BCMA comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 140 o 141. En algunas modalidades, el CAR específico a BCMA comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la

secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 140. En algunas modalidades, el CAR específico a BCMA comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 141. En algunas modalidades, el CAR de BCMA comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 141, sin la secuencia líder alfa de CD8 o la secuencia señal (MALPVTALLLPLALLLHAARP, SEQ ID NO: 89). En algunas modalidades, el CAR de BCMA comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 166.

En algunas modalidades, un CAR de BCMA de la SEQ ID NO: 141 está codificado por la secuencia de ADN de la SEQ ID NO: 171.

Tabla 5. Secuencias de nucleótidos de CAR de BCMA

Nombre	Secuencia de nucleótidos	SEQ ID NO:
CAR de BCMA nt	ATGGCACTGCCCCGTGACCGCCCTGCTGCTGCCTCTGGCCC TGCTGCTGCACGCCGCCGGCCTGAGGTGCAGCTGCTGGA GAGCGGAGGAGGCCTGGTGCAGCCAGGAGGCAGCCTGAG ACTGTCCTGCGCAGCCTCTGGCTTCACCTTCAGCAGCTACG CCATGAACTGGGTGAGGCAGGCACCTGGCAAGGGCCTGGA GTGGGTGAGCGCCATCTCCGACTCTGGCGGCAGCACCTAC TATGCCGATTCCGTGAAGGGCCGCTTCACAATCAGCCGGGA TAACTCCAAGAATACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGA GAGCCGAGGATACAGCCGTGTACTATTGCGCCAGGTATTGG CCAATGGACATCTGGGGCCAGGGGCACACTGGTGACCGTGT CTAGCGGCGGAGGAGGCTCCGGAGGAGGAGGCTCTGGCG GCGGCGGCAGCGAGATCGTGCTGACACAGTCTCCAGGCAC CCTGAGCCTGTCCCCAGGAGAGAGAGCCACCCTGAGCTGT AGGGCCTCTCAGAGCGTGTCTCTAGCTACCTGGCCTGGTA TCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCCCAGACTGCTGATGTAC GACGCCAGCATCAGGGCAACAGGCATCCCCGATCGGTTCT CCGGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTTACACTGACCATCAGC AGGCTGGAGCCCCGAGGACTTCGCCGTGTACTATTGCCAGC AGTATGGCTCCTGGCCTCTGACATTTGGCCAGGGCACCAAG GTGGAGATCAAGGGCTCCGGCGGCGGAGGCTCTTGCCCTT ACAGCAACCCATCCCTGTGCTCTGGAGGAGGAGGCTCCTGT CCCTATAGCAATCCCAGCCTGTGCTCCGGCGGAGGAGGCT CTACCACAACCCCTGCACCACGCCCCCTACACCAGCACCT ACCATCGCCTCTCAGCCTCTGAGCCTGCGGCCCCGAGGCCT GTAGGCCCGCCGCCGGCGGCGCCGTGCACACACGGGGCC	171

	Nombre	Secuencia de nucleótidos	SEQ ID NO:
5		TGGACTTTGCCTGCGACATCTACATCTGGGCACCCCTGGCC GGCACATGTGGCGTGCTGCTGCTGAGCCTGGTCATCACCT GTACTGCAAGAGAGGCAGGAAGAAGCTGCTGTATATCTTCA AGCAGCCCTTCATGCGGCCCGTGCAGACAACCCAGGAGGA GGATGGCTGCTCCTGTGCGTTCCCAGAGGAGGAGGAGGGA GGATGTGAGCTGCGCGTGAAGTTTTCCCGGTCTGCCGACG CACCAGCATACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTATAACGAG 10 CTGAATCTGGGCCCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGATA AGCGGCGGGGCCGGGACCCCGAGATGGGAGGCAAGCCTC GGAGAAAGAACCCACAGGAGGGCCTGTACAATGAGCTGCA GAAGGATAAGATGGCCGAGGCCTATTCTGAGATCGGCATGA AGGGAGAGAGGCGCCGGGGCAAGGGACACGACGGCCTGT 15 ACCAGGGCCTGTCCACAGCCACCAAGGACACCTATGATGCC CTGCACATGCAGGCCCTGCCACCCAGATGA	

En una modalidad, un polipéptido CAR de BCMA de la invención comprende los siguientes dominios: opcionalmente una secuencia líder, una región variable de la cadena pesada (VH), enlazador, región variable de la cadena ligera (VL), interruptor de apagado, bisagra de CD8, dominio transmembrana de CD8, dominio de señalización de 4-1BB y un dominio de CD3-zeta (CD3z o CD3ζ). En algunos aspectos de esta modalidad, el polipéptido CAR de BCMA comprende opcionalmente una secuencia líder que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 89, una región VH que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 144, una secuencia enlazadora que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 167, una región VL que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 145, una región de interruptor de apagado que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 168, una región de bisagra de CD8 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 169, una región TM de CD8 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 170, un dominio de señalización de 4-1BB que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 102, y un dominio de señalización de CD3z que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 103. En algunos aspectos de esta modalidad, el polipéptido CAR de BCMA comprende opcionalmente una secuencia líder que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 89, una región VH que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 144, una secuencia enlazadora que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 167, una región VL que comprende la secuencia de aminoácidos que se

muestra en la SEQ ID NO: 145, una región de interruptor de apagado que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 168, una región de bisagra de CD8 y una región TM que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 101, un dominio de señalización de 4-1BB que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 102, y un dominio de señalización de CD3z que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 103. En algunas modalidades, se usa una secuencia líder diferente.

En otros aspectos de esta modalidad, el polipéptido CAR de BCMA comprende opcionalmente una secuencia líder que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 89, una región VH que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 155, una secuencia enlazadora que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 167, una región VL que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 156, una región de interruptor de apagado que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 168, una región de bisagra de CD8 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 169, una región TM de CD8 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 170, un dominio de señalización de 4-1BB que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 102, y un dominio de señalización de CD3z que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 103.

En otra modalidad, un polipéptido CAR de BCMA de la invención comprende los siguientes dominios: opcionalmente una secuencia líder, una región variable de la cadena pesada (VH), enlazador, región variable de la cadena ligera (VL), un interruptor de apagado, bisagra de CD8, dominio transmembrana de CD8, dominio de señalización de 4-1BB y un dominio de CD3-zeta (CD3z o CD3ζ), en donde el interruptor de apagado se omite opcionalmente y/o solo uno u otro del dominio de señalización de 4-1BB y el dominio de señalización de CD3z está presente, pero no ambos.

En aspectos de cualquiera de estas modalidades, la región de unión extracelular de CAR de BCMA comprende una región VH que comprende una VH CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 146, 147 o 148; una VH CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 149 o 150; y una VH CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 151; y comprende una región VL que comprende una VL CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 152; una VL CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 153; y una VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 154.

En aspectos alternativos de cualquiera de estas modalidades, la región de unión extracelular de CAR de BCMA comprende una región VH que comprende una VH CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 157, 158 o

159; una VH CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 160 o 161; y una VH CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 162; y comprende una región VL que comprende una VL CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 163; una

5 VL CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 164; y una VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 165.

En algunas modalidades, un CAR de BCMA puede introducirse en una célula inmunitaria como un transgén mediante un vector. En algunas modalidades, el vector

10 también puede contener, por ejemplo, un marcador de selección que proporciona identificación y/o selección de las células que recibieron el vector.

En algunas modalidades de la invención, un vector bicistrónico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 172 codifica un polipéptido CAR de BCMA y CACCR predicho que tiene la secuencia de aminoácidos predicha de la SEQ ID NO: 173,

15 que comprende los siguientes dominios: una secuencia señal de CD8 alfa (por ejemplo, SEQ ID NO: 89), dominio de unión a JAK2/transmembrana - TpoR(478-582;S505N,W515K) (por ejemplo, SEQ ID NO: 13), IL2Rb(393-433,518-551) (por ejemplo, SEQ ID NO: 77), P2A (por ejemplo, SEQ ID NO: 105), secuencia señal de CD8 alfa (por ejemplo, SEQ ID NO: 89) y anti-CAR de BCMA de P5A2 con un interruptor de seguridad (por ejemplo, SEQ ID NO: 166).

20 En aspectos de esta modalidad, el vector bicistrónico comprende además, después de la secuencia de codificación del polipéptido, un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota de tipo salvaje WPRE de, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 174 o un WPRE mutante ("mWPRE") de, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 175. En otros aspectos de esta modalidad, el vector

25 bicistrónico no incluye un WPRE de tipo salvaje o un WPRE mutante. En algunos aspectos, la descripción proporciona una célula inmunitaria modificada por ingeniería genética que comprende la secuencia de polinucleótidos de la SEQ ID NO: 172 y expresa un CACCR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 184 o 99, y un CAR de BCMA que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 166. En algunas

30 modalidades, la descripción proporciona una célula inmunitaria modificada por ingeniería genética que expresa un CACCR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 180, 184 o 99, y un CAR de BCMA que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 166. En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada por ingeniería genética es una célula T modificada por ingeniería genética. En algunas modalidades, la

35 célula T modificada por ingeniería genética es una célula T alogénica. En algunas modalidades, la célula T modificada por ingeniería genética es una célula T autóloga.

SEQ ID NO: 172:

atggccctgccagtgaccgccctgctgctgccactggccctgctgctgcacgcagcaaggccatcagaccctacta
gagtcgagaccgctaccgagaccgcttgatctctctggtgaccgccctgcacctggtgctgggcctgaacgccgtgctgggc

ctgctgctgctgaggaagcagttccagcacactaccggagactgaggcacgcactgtggccaagcctgcccacactgcac
 aggggtgctgggacagtatctgagggatacagccgccctgagcccacctaaggcaaccgtgtccgacacatgcgaggaggtg
 gaaccaagtctgctggaaatcctgccaaaatcctctgagcggacacccctgcccctgctcgaggacgagggagtggcagga
 gcaccaaccggcagctccccccagcctctgcagccactgtccggagaggacgatgcatactgcacattcccttctcgggacg
 5 atctgctgctgttctctccaagcggacagggagagtctcgggccctgaacgccagactgcccctgaataccgacgcctatctga
 gcctgcaggagctgcaggacagggacccccacacacctggtgggatccggagccaccaacttctcctgctgaagcaggcc
 ggcatgtggaggagaatccaggccccatggctctgcccgtaccgcactgctgctgcccctggctgctgctgcacgccgc
 aagaccgaggtccagctgctggaatctgggggaggactggtgcagcctggaggcagcctgagactgtcctgcgcagcatct
 ggcttcaccttcagctcctacgccatgaactgggtgaggcaggcaccaggcaagggactggagtgggtgtctgccatctccga
 10 ctctggcggcagcacctactatgccattccgtgaagggccgttcacaatcagccgggataactccaagaataccctgtacct
 gcagatgaattccctgagagccgaggatacagccgtgtactattgccccaggtattggcccatggacatctggggccagggc
 acactggtgaccgtgtctccggaggaggaggctccggaggaggaggctctggcggcggcggcagcgagatcgtgctgac
 acagtctcctggcacccctgagcctgtccccaggagagagagccaccctgagctgtagggcctctcagagcgtgtccttagct
 acctggcctggtatcagcagaagcccggccaggcccctagactgctgtgtacgacgccagcatcagggaacaggcatcc
 15 ctgatcggttctccggctctggcagcggaaccgactttacactgacctcagcaggctggagcccaggacttcgccgtgtact
 attgccagcagtatggctcctggcctctgacatttggccagggcaccaaggtggagatcaagggtccggcggcggagggtct
 tggccatacagcaacccatccctgtgctctggaggaggaggctcctgtccttatagcaatcctagcctgtgtccggcggagga
 ggctctaccacaaccccgacaccaaggccacctacactgcaccaaccatgcctctcagccactgagcctgagacccgag
 gcctgtaggcctgcagcaggaggagcagtgacacccggggactggactttgctgcgatatctacatctgggcaccactgg
 20 caggaacatgtggcgtgctgctgctgagcctggtcatcacctgtactgcaagagaggcaggaagaagctgctgtatatcttca
 agcagccctttatgcgccctgtgcagacaaccaggaggaggatggctgctcctgtcggttccagaggaggaggaggagg
 gatgtgagctgcgcgtgaagttttccggctgcccagcgcaccagcataccagcagggccagaaccagctgtataacgagct
 gaatctggccggagagaggagtacgacgtgctggataagaggaggggaagagatcccagatgggagggaagccacg
 gaaaaagaacccccaggaggggcctgtacaatgagctgcagaaggataagatggccgaggcctatagcgagatcggcag
 25 aaggagagagggcgcgggggcaagggaacgacgagcggcctgtatcagggcctgtccaccgtaccaaagacacatgatg
 ctctgcacatgcaggctctgccaccaagatga

SEQ ID NO: 173:

MALPVTALLPLALLHAARPSDPTRVETATETAWISLVTALHLVLGLNAVLGLLLLR
 KQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSS
 30 ERTPLPILLEDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFSPSRDDLLFSPSGQGEFRALNA
 RLPLNTDAYLSLQELQGQDPHTLVGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMALPVTALLPLALL
 LHAARPEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAISD
 SGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMDIWGQGTLVT
 VSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQK
 35 PGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSWPLTFG
 QGTKVEIKSGGGGSGCPYSNP SLCSGGGGSGCPYSNP SLCSGGGGSTTTPAPRPPTPAPT
 IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA PLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKL
 LYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL

NLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR
GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO: 174: wt WPRE

Aatcaacctctggattacaaaattgtgaaagattgactggtattctaactatgttgctcctttacgctatgtggatacgc
5 tgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttcccgataggctttcattttctcctcctgtataaatcctgggtgctgtctttatgaggagtt
gtggcccggtgtcaggcaacgtggcggtgtgactgtgtttgctgacgcaacccccactggtggggcattgccaccacctgt
cagctcctttccgggactttcgctttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgctgccttggcgctgtggacagg
ggctcggctgttgggcactgacaattccgtggtgtgtcggggaagctgacgtcctttccatggctgctgcctgtgttgcacctg
gattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttcttcccgcggcctgctgccggctctgc
10 ggccttctccgcgtcttgccttcgccctcagacgagtcggatctcccttgggcccgcctccccgcctg

SEQ ID NO: 175: mWPRE

Aatcaacctctggattacaaaattgtgaaagattgactggtattctaactatgttgctcctttacgctatgtggatacgc
tgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttcccgataggctttcattttctcctcctgtataaatcctgggtgctgtctttatgaggagtt
gtggcccggtgtcaggcaacgtggcggtgtgactgtgtttgctgacgcaacccccactggtggggcattgccaccacctgt
15 cagctcctttccgggactttcgctttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgctgccttggcgctgtggacagg
ggctcggctgttgggcactgacaattccgtggtgtgtcggggaatcatcgtcctttcctggctgctgcctgtgttgcacctgg
attctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttcttcccgcggcctgctgccggctctgcg
gccttctccgcgtcttgccttcgccctcagacgagtcggatctcccttgggcccgcctccccgcctg

En modalidades de la invención, un vector bicistrónico que comprende la secuencia
20 de nucleótidos de la SEQ ID NO: 176 codifica un polipéptido CAR de BCMA y CACCR
predicho que tiene la secuencia de aminoácidos predicha de la SEQ ID NO: 177, que
comprende los siguientes dominios: péptido señal de CD8 (por ejemplo, SEQ ID NO: 89),
dominio de unión a JAK2/transmembrana - TpoR(478-582;H499L,S505N,W515K) (por
ejemplo, SEQ ID NO: 12), IL2Rb(339-379,393-433,518-551) (por ejemplo, SEQ ID NO: 78),
25 P2A (por ejemplo, SEQ ID NO: 105), secuencia señal de CD8 alfa (por ejemplo, SEQ ID NO:
89) y CAR de BCMA de P5A2 con un interruptor de seguridad (por ejemplo, SEQ ID NO:
166). En aspectos de esta modalidad, el vector bicistrónico comprende además, después de
la secuencia de codificación del polipéptido, un WPRE de tipo salvaje de, por ejemplo, la
SEQ ID NO: 174 o un WPRE mutante ("mWPRE") de, por ejemplo, la secuencia de
30 nucleótidos de la SEQ ID NO: 175. En otros aspectos de esta modalidad, el vector
bicistrónico no incluye un WPRE de tipo salvaje o un WPRE mutante. En algunos aspectos,
la descripción proporciona una célula inmunitaria modificada por ingeniería genética que
comprende la secuencia de polinucleótidos de la SEQ ID NO: 176 y expresa un CACCR que
comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 185 o 100, y un CAR de BCMA
35 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 166. En algunas
modalidades, la descripción proporciona una célula inmunitaria modificada por ingeniería
genética que expresa un CACCR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ
ID NO: 181, 185 o 100, y un CAR de BCMA que comprende la secuencia de aminoácidos
de la SEQ ID NO: 166. En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada por

ingeniería genética es una célula T modificada por ingeniería genética. En algunas modalidades, la célula T modificada por ingeniería genética es una célula T alogénica. En algunas modalidades, la célula T modificada por ingeniería genética es una célula T autóloga.

5 SEQ ID NO: 176:

atggccctgccagtgaccgccctgctgctgccactggccctgctgctgcacgcagcaaggccatcagaccctacta
gagtcgagaccgctaccgagaccgcttgatctctctggtgaccgccctgctgctggtgctgggctgaacgccgtgctggggc
tgctgctgctgaggaagcagttcccagcacactaccggagactgaggcacgcactgtggccaagcctgcccagctgcaca
gggtgctgggacagtatctgagggatacagccgccctgagcccacctaaggcaaccgtgtccgacacatgagaggaggtg
10 aaccaagtctgctggaaatcctgcaaaatcctctgagcggacacccctgcccctgctgagcagcaggacaagggtcccg
agcctgctccctgagctccaaccacagcctgacctcctgctttacaatcagggctactcttttccacctgctgacgccctgg
agatcagggcctgtcaggatgagggagtggcaggagcacctaccggctctagcccacagccactgcagccactgtctggag
aggacgatgcctactgcacattccccagccgggacgatctgctgctgtttcccccttggacagggagagtccggggccctgaa
cgcaagactgccactgaataccgacgcctatctgtctgagcagctgcagggccaggacccacacacctggtgggatcc
15 ggagccaccaacttctccctgctgaagcagggcggcgatgtggaggagaatccaggcccatggctctgcccgtcaccgca
ctgctgctgcccctggctctgctgctgcacgccgcaagacccgaggtccagctgctggaatctgggggaggactggtgcagcc
tggaggcagcctgagactgtcctgagcagcatctggcttcaccttcagctcctacgccatgaactgggtgaggcaggcaccag
gcaagggactggagtgggtgtctgccatctccgactctggcggcagcacctactatgccgattccgtgaagggccgcttcaca
atcagccgggataactccaagaataccctgtacctgcagatgaattccctgagagccgaggatacagccgtgtactattgagc
20 caggtattggcccatggacatctggggccagggcacactggtgaccgtgtcttccggaggaggaggtccggaggaggagg
ctctggcggcggcggcagcagatctgctgacacagctcctggcacccctgagcctgtccccaggagagagagccaccct
gagctgtagggcctctcagagcgtgtccttagctacctggcctggtatcagcagaagcccgccaggcccttagactgtgat
gtacgacgccagcatcagggcaacaggcatccctgatcggttctccggctctggcagcggaaaccgactttacactgaccatca
gcaggctggagcccaggacttcgccgtgtactattgccagcagtatggctcctggcctctgacattggccagggcaccaag
25 gtggagatcaagggtccggcggcggaggctcttggccatacagcaacccatccctgtgctctggaggaggaggctcctgtc
cttatagcaatcctagcctgtgtccggcggaggaggctctaccacaacccagcaccaaggccacctacacctgcaccaac
catcgctctcagccactgagcctgagacccgaggcctgtaggcctgcagcaggaggagcagtgacacccggggactgg
actttgcctgcgatatctacatctgggcaccactggcaggaacatgtggcgtgctgctgagcctggtcatccctgtactgc
aagagaggcaggaagaagctgctgtatatctcaagcagcccttatgcgccctgtgcagacaacccaggaggaggatggct
30 gctcctgtcggttcccagaggaggaggaggaggatgtgagctgcgcgtgaagtttccggctgtccgacgcaccagcatac
cagcagggccagaaccagctgtataacgagctgaatctgggcccggagagaggagtacgacgtgtggataagaggaggg
gaagagatcccagatgggagggaagccacggagaaagaacccccaggagggcctgtacaatgagctgcagaaggata
agatggccgaggcctatagcgagatcgcatgaaggagagaggcgccggggcaagggaacgacgagccctgtatcagg
gcctgtccaccgctaccaaagacacctatgatgtctgcacatgcaggctctgccaccaagatga

35 SEQ ID NO: 177

MALPVTALLPLALLHAARPSDPTRVETATETAWISLVTALLVLGLNAVLGLLLLR
KQFPAHYRRLRHAWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSS
ERTPLPLLEQQDKVPEPASLSSNHSLSCTFNQGYFFHLPDALEIEACQDEGVAGAPTG
SSPQPLQPLSGEDDAYCTFSPSRDDLLLFSPSGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQD

PTHLVGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLLESGGGLV
 QPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAISDSGGSTYYADSVKGRFTIS
 RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMDIWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGG
 GSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGI
 5 PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSWPLTFGQGTKVEIKSGGGGGSCPY
 SNPSLCSGGGGSCPYSNPSLCSGGGGSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG
 GAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE
 DGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR
 DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKD
 10 TYDALHMQALPPR

En modalidades de la invención, un vector bicistrónico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 178 codifica un polipéptido CAR de BCMA y CACCR predicho que tiene la secuencia de aminoácidos predicha de la SEQ ID NO: 179, que comprende los siguientes dominios: péptido señal de CD8 (por ejemplo, SEQ ID NO: 89),
 15 dominio de unión a JAK2/transmembrana - TpoR(478-582;H499L,S505N,W515K) (por ejemplo, SEQ ID NO: 12), IL2Rb(393-433,518-551) (por ejemplo, SEQ ID NO: 77), P2A (por ejemplo, SEQ ID NO: 105), secuencia señal de CD8 alfa (por ejemplo, SEQ ID NO: 89) y CAR de BCMA de P5A2 con un interruptor de seguridad (por ejemplo, SEQ ID NO: 141). En aspectos de esta modalidad, el vector bicistrónico comprende, además, después de la
 20 secuencia de codificación del polipéptido, un WPRE de tipo salvaje de, por ejemplo, la SEQ ID NO: 174 o un WPRE mutante ("mWPRE") de, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 175. En otros aspectos de esta modalidad, el vector bicistrónico no incluye un WPRE de tipo salvaje o un WPRE mutante.

En algunas modalidades, la descripción proporciona una célula inmunitaria
 25 modificada por ingeniería genética que comprende la secuencia de polinucleótidos de la SEQ ID NO: 178 y expresa un CACCR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 186 o 143 y un CAR de BCMA que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 166. En algunas modalidades, la descripción proporciona una célula inmunitaria modificada por ingeniería genética que expresa un CACCR que comprende la
 30 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 182, 186 o 143, y un CAR de BCMA que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 166. En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada por ingeniería genética es una célula T modificada por ingeniería genética. En algunas modalidades, la célula T modificada por ingeniería genética es una célula T alogénica. En algunas modalidades, la célula T modificada por ingeniería
 35 genética es una célula T autóloga.

SEQ ID NO: 178:

atggccctgccagtgaccgccctgctgctgccactggccctgctgctgcacgcagcaaggccatcagaccctacta
 gattcgagaccgctaccgagaccgcttgatctctctggtgaccgccctgctgctggtgctgggcctgaacgccgtgctgggccc
 tgctgctgctgaggaagcagttcccagcacactaccggagactgaggcacgcactgtggccaagcctgcccacacctgcaca

ggggtgctgggacagtatctgagggatacagccgccctgagcccacctaaggcaaccgtgtccgacacatgcgaggaggtgg
 aaccaagtctgctggaaatcctgccaaaatcctctgagcggacacccctgccctgctcgaggacgagggagtgaggagga
 caccaaccggcagctccccccagcctctgcagccactgtccggagaggacgatgcatactgcacattcccttctcgggacgat
 ctgctgctgttctccaagcggacagggagagttcggggccctgaacgccagactgcccctgaataccgacgcctatctgagc
 5 ctgcaggagctgcagggacaggacccccacacacctggtgggatccggagccaccaacttctccctgctgaagcaggccgg
 cgatgtggaggagaatccaggccccatggctctgcccgtcaccgcactgctgctgcccctggctctgctgctgcacgccgcaa
 gaccgaggtccagctgctggaatctgggggaggactggtgcagcctggaggcagcctgagactgtcctgcgcagcatctgg
 cttcacctcagctcctacgccatgaactgggtgaggcaggcaccaggcaagggactggagtgggtgtctgccatctccgact
 ctggcggcagcacctactatgccgattccgtgaagggccgcttcacaatcagccgggataactccaagaataccctgtacctg
 10 cagatgaattccctgagagccgaggatacagccgtgtactattgcgccaggtattggccatggacatctggggccagggcac
 actggtgaccgtgtcttccggaggaggaggtccggaggaggaggtctggtggcgggcgggcagcgagatcgtgctgacac
 agtctcctggcaccctgagcctgtccccaggagagagagccaccctgagctgtagggcctctcagagcgtgtccttagctac
 ctggcctggtatcagcagaagccccggccaggccccctagactgctgtatgtacgacgccagcatcagggaacaggcatccct
 gatcggttctccggctctggcagcggaaccgactttacactgaccatcagcaggctggagccccgaggacttcgccgtgtactat
 15 tgccagcagatggctcctggcctctgacatttggccagggcaccaagggtggagatcaagggctccggcgggcgaggctcttg
 cccatacagcaacccatccctgtgctctggaggaggaggtcctgtccttatagcaatcctagcctgtgctccggcgaggagg
 ctctaccacaacccccagcaccaaggccacctacacctgcaccaaccatcgccctcagccactgagcctgagaccgaggc
 ctgtaggcctgcagcaggaggagcagtgcacacccggggactggactttgcctgcgatatctacatctgggcaccactggca
 ggaacatgtggcgtgctgctgctgagcctggtcatccctgtactgcaagagaggcaggaagaagctgctgtatatcttcaag
 20 cagccctttatgcgccctgtgcagacaaccaggaggaggtggtgctcctgtcggttccagaggaggaggaggaggagga
 tgtgagctgcgcgtgaagtttcccggtctgccgacgcaccagcataccagcagggccagaaccagctgtataacgagctga
 atctgggcccggagagaggagtagcagctgtggataagaggaggggaagagatcccagagatgggaggcaagccacgga
 gaaagaacccccaggagggcctgtacaatgagctgcagaaggataagatggccgaggcctatagcgagatcggcgatgaa
 gggagagaggcgccggggcaagggaacacgacggcctgtatcagggcctgtccaccgctaccaaagacacctatgatgctc
 25 tgcacatgcaggctctgccaccaagatga

SEQ ID NO: 179:

MALPVTALLPLALLHAARPSDPTRVETATETAWISLVTALLVLGLNAVLGLLLLR
 KQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVEPSLLEILPKSS
 ERTPLPLLEDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLFSPSGQGEFRALNA
 30 RLPLNTDAYLSLQELQGQDPHTLVGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMALPVTALLPLALL
 LHAARPEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAISD
 SGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMDIWGQGTLVT
 VSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQK
 PGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSWPLTFG
 35 QGTKVEIKSGGGGSCPYSNPSLCSGGGGSCPYSNPSLCSGGGGSTTTPAPRPPTPAPT
 IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKL
 LYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL
 NLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR
 GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

En algunas modalidades de la invención, un vector bicistrónico codifica un polipéptido que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 173, 177 o 179. En algunas modalidades, la invención proporciona además una célula, como una célula inmunitaria, por ejemplo, una célula T, que contiene un vector bicistrónico que codifica un polipéptido que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 173, 177 o 179. En algunas modalidades, la invención proporciona además un método para tratar una enfermedad caracterizada por la expresión de BCMA, tal como el mieloma múltiple, que comprende administrar dicha célula a un paciente que padece la enfermedad.

En algunas modalidades, la célula inmunitaria con CAR (por ejemplo, la célula T con CAR) de la descripción comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que induce la apoptosis, tal como por ejemplo RQR8 o R2. Ver, por ejemplo, el documento núm. WO2013153391A, que se incorpora por la presente por referencia en su totalidad. En algunas modalidades, un polipéptido que induce la apoptosis se expresa en la superficie de la célula. En algunas modalidades, el constructo de CAR incluye un polipéptido que induce la apoptosis. En algunas modalidades, un polipéptido suicida no es parte del constructo de CAR.

En algunas modalidades, el dominio extracelular de cualquiera de los CAR descritos en la presente descripción puede comprender uno o más epítopos específicos para (es decir, reconocidos específicamente por) un anticuerpo monoclonal. En la presente descripción, estos epítopos también se denominan epítopos específicos para AcM. Se describen los epítopos ilustrativos específicos para AcM en la publicación de patente internacional núm. WO 2016/120216, que se incorpora en la presente descripción en su totalidad. En estas modalidades, el dominio extracelular de los CAR comprende dominios de unión al antígeno que se unen específicamente al objetivo de interés y uno o más epítopos que se unen a uno o más anticuerpos monoclonales (AcM). Los CAR que comprenden los epítopos específicos para AcM pueden ser monocatenarios o multicatenarios.

La inclusión de epítopos específicos para anticuerpos monoclonales en el dominio extracelular de los CAR descritos en la presente descripción permite la separación y la reducción de las células inmunitarias modificada por ingeniería genética que expresan los CAR. En algunas modalidades, permitir la reducción proporciona un interruptor de seguridad en caso de efectos perjudiciales, por ejemplo, tras la administración a un sujeto.

También se proporcionan en la presente descripción los métodos para preparar las células inmunitarias modificadas por ingeniería genética para su uso en la inmunoterapia. En algunas modalidades, los métodos comprenden introducir un CACCR y un CAR en las células inmunitarias y expandir las células. En algunas modalidades, la invención se refiere a un método de ingeniería genética de una célula inmunitaria que comprende: proporcionar una célula y expresar un CACCR, y expresar en la superficie de la célula al menos un CAR.

En algunas modalidades, el método comprende: transfectar la célula con al menos un polinucleótido que codifica un CACCR, y al menos un polinucleótido que codifica un CAR, y expresar los polinucleótidos en la célula. En algunas modalidades, el método comprende: transfectar la célula con al menos un polinucleótido que codifica un CACCR, al menos un polinucleótido que codifica un CAR y expresar los polinucleótidos en la célula.

En algunas modalidades, los polinucleótidos que codifican el CACCR y el CAR están presentes en uno o más vectores de expresión para una expresión estable en las células. En algunas modalidades, los polinucleótidos están presentes en vectores virales para una expresión estable en las células. En algunas modalidades, los vectores virales pueden ser, por ejemplo, vectores lentivirales o vectores adenovirales.

En algunas modalidades, los polinucleótidos que codifican los polipéptidos de acuerdo con la presente descripción pueden ser ARNm que se introduce directamente en las células, por ejemplo, por electroporación. En algunas modalidades, la tecnología de electroporación CytoPulse, tal como PulseAgile, puede usarse para permeabilizar transitoriamente las células vivas para el suministro del material a las células (por ejemplo, documentos núms. US 6,078,490; PCT/US2011/000827 y PCT/US2004/005237). Los parámetros pueden modificarse para determinar las condiciones para una alta eficiencia de transfección con una mortalidad mínima.

En la presente descripción también se proporcionan los métodos para transfectar una célula inmunitaria, por ejemplo, una célula T. En algunas modalidades, el método comprende: poner en contacto una célula T con ARN y aplicar a la célula T una secuencia de pulsos Agile. En algunas modalidades, un método para transfectar una célula inmunitaria (por ejemplo, una célula T) comprende poner en contacto la célula inmunitaria con ARN y aplicar a la célula una secuencia de pulsos Agile.

En algunas modalidades, el método puede comprender además una etapa de modificar genéticamente una célula mediante la inactivación de expresar al menos un gen, por ejemplo, sin limitación, un componente del TCR, una objetivo para un agente inmunosupresor, un gen HLA y/o una proteína de punto de control inmunitario como, por ejemplo, PDCD1 o CTLA-4. Al inactivar un gen se pretende que el gen de interés no se exprese en una forma de proteína funcional. En algunas modalidades, el gen que va a inactivarse se selecciona del grupo que consiste en, por ejemplo, sin limitación, TCR α , TCR β , CD52, GR, deoxicitidina quinasa (DCK), PD-1, y CTLA-4. En algunas modalidades, el método comprende inactivar uno o más genes mediante la introducción en las células de una endonucleasa de corte raro capaz de inactivar selectivamente un gen mediante la escisión selectiva de ADN. En algunas modalidades, la endonucleasa de corte raro puede ser, por ejemplo, una nucleasa efectora activadora de la transcripción (nucleasa TALE) o endonucleasa a base de CRISPR (por ejemplo, Cas-9 o Cas12a).

En otro aspecto, una etapa de modificación genética de las células puede comprender: modificar las células inmunitarias (por ejemplo, las células T) mediante la

inactivación de al menos un gen que expresa una objetivo para un agente inmunosupresor, y; expandir las células, opcionalmente en presencia del agente inmunosupresor.

En algunas modalidades, las células inmunitarias modificadas por ingeniería genética (por ejemplo, las células T) proporcionadas en la presente descripción exhiben una
5 citotoxicidad mejorada, mayor expansión y/o niveles aumentados de marcadores de fenotipo de memoria en relación con las células inmunitarias modificadas por ingeniería genética que no expresan el CACCR.

En algunas modalidades, las células inmunitarias modificadas por ingeniería genética (por ejemplo, las células T) proporcionadas en la presente descripción exhiben (i)
10 una mayor persistencia *in vivo*, (ii) una mayor activación de STAT, (iii) una mayor citotoxicidad, (iv) un aumento de los niveles de marcadores de fenotipo de memoria, (v) aumento de la expansión (proliferación), o las combinaciones de estas características funcionales de forma constitutiva, en relación con las células inmunitarias modificadas por ingeniería genética que no expresan el CACCR. En algunas modalidades, la mejora en una
15 o más características funcionales descritas en la presente descripción puede ajustarse, que dependen de las mutaciones/modificaciones introducidas en el CACCR. En algunas modalidades, los STAT activados por la célula inmunitaria modificada por ingeniería genética que comprende uno o más CACCR descritos son STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5, STAT6 o las combinaciones de estos. En una modalidad, los marcadores de fenotipo de
20 memoria que aumentan o mantienen la célula inmunitaria que comprende el CACCR incluyen el marcador de memoria de células madre (Tscm) y el marcador de memoria central (Tcm).

En algunas modalidades, la mejora en una o más características funcionales exhibidas por una célula inmunitaria modificada por ingeniería genética que comprende un
25 CACCR proporcionado en la presente descripción es al menos aproximadamente 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 125 veces, 150 veces, 200 veces, 250 veces, 300 veces, 350 veces, 400 veces, 450 veces o incluso aproximadamente 500 veces, incluidos
30 los valores y los intervalos entre ellos, en comparación con una célula inmunitaria que no expresa el CACCR.

En algunas modalidades, la mejora en una o más características funcionales exhibidas por una célula inmunitaria modificada por ingeniería genética que comprende un
35 CACCR proporcionado en la presente descripción es de al menos aproximadamente 10 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 90 %, 100 %, 125 %, 150 %, 200 %, 250 %, 300 %, 350 %, 400 % o incluso aproximadamente 500 %, incluidos los valores y los intervalos entre ellos, en comparación con una célula inmunitaria modificada por ingeniería genética que no expresa el CACCR.

III. Métodos terapéuticos

En la presente descripción se proporcionan las composiciones farmacéuticas que comprenden las células que tienen los CACCR y los CAR de la descripción.

- Las células inmunitarias modificadas por ingeniería genética que tienen CACCR y
- 5 CAR de BCMA (por ejemplo, las células T con CAR de BCMA) obtenidas mediante los métodos descritos anteriormente, o las líneas celulares derivadas de dichas células inmunitarias modificadas por ingeniería genética, pueden usarse como medicamento. En algunas modalidades, dicho medicamento puede usarse para tratar un trastorno tal como, por ejemplo, una enfermedad viral, una enfermedad bacteriana, un cáncer, una enfermedad
- 10 inflamatoria, una enfermedad inmunitaria o una enfermedad asociada al envejecimiento. En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer sólido. En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer líquido. El cáncer puede seleccionarse del grupo que consiste en cáncer gástrico, sarcoma, linfoma, leucemia, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de timo, cáncer epitelial, cáncer de las glándulas salivales, cáncer de hígado, cáncer de estómago, cáncer de tiroides,
- 15 cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, glioma, leucemia, mieloma múltiple, neoplasia maligna de células B, linfoma difuso de células B grandes, carcinoma de células renales, cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, coriocarcinoma, cáncer de colon, cáncer oral, cáncer de piel y melanoma. En algunas modalidades, el sujeto es un sujeto adulto tratado previamente con
- 20 melanoma localmente avanzado o metastásico, cáncer de cabeza y cuello de células escamosas (SCHNC), carcinoma de ovario, sarcoma, o linfoma de Hodgkin clásico en recaída o resistente (cHL).

- En algunas modalidades, las células inmunitarias modificadas por ingeniería genética, o una línea celular derivada de las células inmunitarias modificadas por ingeniería
- 25 genética, pueden usarse en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno en un sujeto que lo necesite. En algunas modalidades, el trastorno puede ser, por ejemplo, un cáncer, un trastorno autoinmunitario o una infección.

En la presente descripción también se proporcionan los métodos para tratar los sujetos que necesitan dicho tratamiento.

- 30 Como se usa en la presente descripción, el término “sujeto” se refiere a cualquier vertebrado, que incluye, sin limitación, humanos y otros primates (por ejemplo, chimpancés, monos cynomologous y otras especies de simios y monos), animales de granja (por ejemplo, ganado, ovejas, cerdos, cabras y caballos), mamíferos domésticos (por ejemplo, perros y gatos), animales de laboratorio (por ejemplo, conejos, roedores, tales como ratones, ratas y
- 35 cobayas) y aves (por ejemplo, aves domésticas, silvestres y de caza, tales como pollos, pavos y otras aves gallináceas, patos, gansos y similares). En algunas modalidades, el sujeto es un mamífero. En modalidades ilustrativas, el sujeto es un ser humano.

En algunas modalidades, el método comprende proporcionar las células inmunitarias de la descripción, que tienen los CACCR y los CAR (por ejemplo, un CAR de BCMA) descritos en la presente descripción a un sujeto que lo necesite.

- 5 En algunas modalidades, las células T que tienen CACCR y CAR de la invención pueden experimentar una expansión de células T *in vivo* fuerte y pueden persistir durante un período de tiempo prolongado.

Los métodos de tratamiento de la invención pueden ser mejoradores, curativos o profilácticos. El método de la invención puede ser parte de una inmunoterapia autóloga o parte de un tratamiento de inmunoterapia alogénica.

- 10 En otro aspecto, la invención proporciona un método para inhibir el crecimiento o la progresión tumoral en un sujeto que tiene un tumor, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de las células inmunitarias que expresan CACCR y CAR (por ejemplo, que expresan CAR de BCMA) como se describe en la presente descripción. En otro aspecto, la invención proporciona un método para inhibir o prevenir las metástasis de las células
- 15 cancerosas en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de las células inmunitarias modificadas por ingeniería genética como se describe en la presente descripción. En otro aspecto, la invención proporciona un método para inducir la regresión del tumor en un sujeto que tiene un tumor, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de las células inmunitarias modificadas por ingeniería genética como se
- 20 describe en la presente descripción.

En algunas modalidades, las células T modificadas por ingeniería genética de la presente pueden administrarse por vía parenteral en un sujeto. En algunas modalidades, las células T modificadas por ingeniería genética en la presente descripción pueden administrarse por vía intravenosa en un sujeto.

- 25 También se proporciona el uso de cualquiera de las células T modificadas por ingeniería genética proporcionadas en la presente descripción en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer o para inhibir el crecimiento o la progresión tumoral en un sujeto que lo necesite.

- 30 En algunas modalidades, el tratamiento puede administrarse a los sujetos que se someten a un tratamiento inmunosupresor. De hecho, la invención se basa preferentemente en las células o las poblaciones de células que se han hecho resistentes a al menos un agente inmunosupresor debido a la inactivación de un gen que codifica un receptor para dicho agente inmunosupresor. En este aspecto, el tratamiento inmunosupresor debería ayudar a la selección y la expansión de las células T de acuerdo con la invención dentro del
- 35 sujeto. La administración de las células o la población de células de acuerdo con la invención pueden llevarse a cabo de cualquier manera conveniente, que incluyen la inhalación, la inyección, la ingestión, la transfusión, la implantación o el trasplante. Las composiciones descritas en la presente descripción pueden administrarse a un sujeto por vía subcutánea, intradérmica, intratumoral, intranodal, intramedular, intramuscular, mediante inyección

intravenosa o intralinfática o intraperitoneal. Las células que tienen los CACCR y los CAR (por ejemplo, un CAR de BCMA) de la descripción o las composiciones farmacéuticas de estas pueden administrarse mediante una o más de las siguientes vías de administración: intravenosa, intraocular, intravítrea, intramuscular, subcutánea, tópica, oral, transdérmica,

5 intraperitoneal, intraorbital, por implantación, por inhalación, intratecal, intraventricular, a través del oído o intranasal.

En algunas modalidades, la administración de las células o la población de células (que tienen los CACCR y los CAR, por ejemplo, un CAR de BCMA, de la descripción) puede comprender la administración de, por ejemplo, aproximadamente 10^4 a aproximadamente

10 10^9 células por kg de peso corporal, incluidos todos los valores enteros de cantidades de células dentro de esos intervalos. En algunas modalidades, la administración de las células o la población de células puede comprender la administración de aproximadamente 10^4 a 10^5 células por kg de peso corporal, de 10^5 a 10^6 células por kg de peso corporal, de 10^6 a 10^7 células por kg de peso corporal, de 10^7 a 10^8 células por kg de peso corporal, o de 10^8

15 a 10^9 células por kg de peso corporal. Las células o la población de células pueden administrarse en una o más dosis. En algunas modalidades, dicha cantidad eficaz de las células puede administrarse como una dosis única. En algunas modalidades, dicha cantidad eficaz de las células puede administrarse como más de una dosis durante un período de tiempo. El momento de la administración está a juicio del médico responsable y depende del

20 estado clínico del sujeto. Las células o la población de células pueden obtenerse de cualquier fuente, como un banco de sangre o un donante. Si bien las necesidades individuales varían, la determinación de los intervalos óptimos de las cantidades eficaces de un tipo de célula dado para una enfermedad o afecciones particulares está dentro del conocimiento de la técnica. Una cantidad eficaz significa una cantidad que proporciona un

25 beneficio terapéutico o profiláctico. La dosis administrada dependerá de la edad, la salud y el peso del receptor, el tipo de tratamiento concurrente, si lo hay, la frecuencia del tratamiento y la naturaleza del efecto deseado. En algunas modalidades, una cantidad eficaz de las células o la composición que comprende esas células se administra por vía parenteral. En algunas modalidades, la administración puede ser una administración intravenosa. En

30 algunas modalidades, la administración puede realizarse directamente mediante la inyección dentro de un tumor.

De acuerdo con lo anterior, una dosis apropiada de una célula de la invención (por ejemplo, las células T alogénicas o autólogas que expresan CACCR y CAR de BCMA) puede ser entre aproximadamente 7×10^6 células y aproximadamente 480×10^6 células. En

35 determinadas modalidades, una dosis apropiada puede variar desde aproximadamente 20×10^6 células/dosis a aproximadamente 480×10^6 células/dosis, con mayor particularidad aproximadamente 20×10^6 células/dosis, aproximadamente 40×10^6 células/dosis, aproximadamente 60×10^6 células/dosis, aproximadamente 80×10^6 células/dosis, aproximadamente 100×10^6 células/dosis, aproximadamente 120×10^6 células/dosis,

aproximadamente 160×10^6 células/dosis, aproximadamente 240×10^6 células/dosis, aproximadamente 300×10^6 células/dosis, aproximadamente 320×10^6 células/dosis, aproximadamente 360×10^6 células/dosis, aproximadamente 400×10^6 células/dosis, aproximadamente 440×10^6 células/dosis, o aproximadamente 480×10^6 células/dosis.

- 5** En determinadas modalidades, cuando el peso del sujeto es de 50 kg o más, y al menos va a administrarse al paciente una dosis de células, una dosis apropiada puede variar de aproximadamente 20×10^6 células/dosis a aproximadamente 480×10^6 células/dosis, con mayor particularidad de aproximadamente 20×10^6 células/dosis, aproximadamente 40×10^6 células/dosis, aproximadamente 80×10^6 células/dosis, aproximadamente 120×10^6 células/dosis, aproximadamente 240×10^6 células/dosis, aproximadamente 320×10^6 células/dosis, aproximadamente 360×10^6 células/dosis, o aproximadamente 480×10^6 células/dosis. En determinadas modalidades, cuando el peso del sujeto es menor de 50 kg, y al menos una dosis de células debe administrarse al paciente, una dosis apropiada puede variar de aproximadamente 7×10^6 células/dosis a aproximadamente 360×10^6 células/dosis, con mayor particularidad de aproximadamente 7×10^6 células/dosis, aproximadamente 14×10^6 células/dosis, aproximadamente 20×10^6 células/dosis, aproximadamente 80×10^6 células/dosis, aproximadamente 240×10^6 células/dosis, o aproximadamente 360×10^6 células/dosis.

- 20** Los métodos pueden comprender además administrar uno o más agentes a un sujeto antes de administrar las células inmunitarias modificadas por ingeniería genética que tienen un CAR (por ejemplo, un CAR de BCMA) y un CACCR proporcionados en la presente descripción. En determinadas modalidades, el agente es un régimen de reducción de linfocitos (preacondicionamiento). Por ejemplo, los métodos de reducción de linfocitos a un sujeto que necesita dicha terapia comprenden administrar al sujeto las dosis beneficiosas específicas de ciclofosfamida (entre $200 \text{ mg/m}^2/\text{día}$ y $2000 \text{ mg/m}^2/\text{día}$, aproximadamente $100 \text{ mg/m}^2/\text{día}$ y aproximadamente $2000 \text{ mg/m}^2/\text{día}$; por ejemplo, de aproximadamente $100 \text{ mg/m}^2/\text{día}$, aproximadamente $200 \text{ mg/m}^2/\text{día}$, aproximadamente $300 \text{ mg/m}^2/\text{día}$, aproximadamente $400 \text{ mg/m}^2/\text{día}$, aproximadamente $500 \text{ mg/m}^2/\text{día}$, aproximadamente $600 \text{ mg/m}^2/\text{día}$, aproximadamente $700 \text{ mg/m}^2/\text{día}$, aproximadamente $800 \text{ mg/m}^2/\text{día}$, aproximadamente $900 \text{ mg/m}^2/\text{día}$, aproximadamente $1000 \text{ mg/m}^2/\text{día}$, aproximadamente $1500 \text{ mg/m}^2/\text{día}$ o aproximadamente $2000 \text{ mg/m}^2/\text{día}$) y las dosis especificadas de fludarabina (entre $20 \text{ mg/m}^2/\text{día}$ y $900 \text{ mg/m}^2/\text{día}$, entre aproximadamente $10 \text{ mg/m}^2/\text{día}$ y aproximadamente $900 \text{ mg/m}^2/\text{día}$; por ejemplo, de aproximadamente $10 \text{ mg/m}^2/\text{día}$, aproximadamente $20 \text{ mg/m}^2/\text{día}$, aproximadamente $30 \text{ mg/m}^2/\text{día}$, aproximadamente $40 \text{ mg/m}^2/\text{día}$, aproximadamente $40 \text{ mg/m}^2/\text{día}$, aproximadamente $50 \text{ mg/m}^2/\text{día}$, aproximadamente $60 \text{ mg/m}^2/\text{día}$, aproximadamente $70 \text{ mg/m}^2/\text{día}$, aproximadamente $80 \text{ mg/m}^2/\text{día}$, aproximadamente $90 \text{ mg/m}^2/\text{día}$, aproximadamente $100 \text{ mg/m}^2/\text{día}$, aproximadamente $500 \text{ mg/m}^2/\text{día}$ o aproximadamente $900 \text{ mg/m}^2/\text{día}$). Un régimen de administración ilustrativo involucra tratar a un sujeto que comprende administrar diariamente

al paciente aproximadamente 300 mg/m²/día de ciclofosfamida en combinación o antes o después de administrar aproximadamente 30 mg/m²/día de fludarabina durante tres días antes de la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de las células T modificadas por ingeniería genética.

- 5** En algunas modalidades, específicamente en el caso en que las células modificadas por ingeniería genética proporcionadas en la presente descripción se han sometido a edición de genes para eliminar o minimizar la expresión superficial de CD52, la reducción de linfocitos comprende además la administración de un anticuerpo anti-CD52, tal como el alemtuzumab (CAS (Chemical Abstract Service) Registro # 216503-57-0). En algunas
- 10** modalidades, el anticuerpo contra CD52 se administra a una dosis de aproximadamente 1-20 mg/día por vía IV, por ejemplo, aproximadamente 13 mg/día por vía IV durante 1, 2, 3 o más días, o aproximadamente 20 mg/día por vía IV durante 1, 2, 3 o más días. En algunas modalidades, el anticuerpo contra CD52 se administra a una dosis de aproximadamente 20-30 mg/día por vía IV, por ejemplo, aproximadamente 30 mg/día por vía IV durante 1, 2, 3 o
- 15** más días. El anticuerpo puede administrarse en combinación con, antes o después de la administración de otros elementos de un régimen de reducción de linfocitos (por ejemplo, ciclofosfamida y/o fludarabina).

- En algunas modalidades, puede administrarse al paciente una cantidad eficaz de las células inmunitarias modificadas por ingeniería genética después de la dosis inicial o primera
- 20** (es decir, una nueva dosis). La segunda o posterior dosificación puede ser igual, o mayor o menor que, la cantidad de células inmunitarias modificadas por ingeniería genética de la dosificación anterior. En algunas modalidades, se administra al paciente un régimen de reducción de linfocitos antes de una segunda o posterior dosificación de las células inmunitarias modificadas por ingeniería genética. En algunas modalidades, la segunda o
- 25** posterior dosificación no está precedida por un régimen de reducción de linfocitos.

- En determinadas modalidades, las composiciones que comprenden las células efectoras inmunitarias que expresan CAR y CACCR (por ejemplo, que expresan CAR de BCMA) descritas en la presente descripción pueden administrarse en conjunto con cualquier cantidad de agentes quimioterapéuticos.

- 30** En determinadas modalidades, a los pacientes que han recibido las células T con CAR de BCMA y CACCR de la descripción se les administra posteriormente una cantidad eficaz de ribuximab y/o dasatinib para reducir o mitigar cualquier problema de seguridad potencial durante el curso del tratamiento con T con CAR. En determinadas modalidades, los pacientes reciben terapia con T con CAR de BCMA para el tratamiento del mieloma
- 35** múltiple u otros cánceres positivos para BMCA.

IV. Kits y artículos de fabricación

La presente descripción proporciona los kits que comprenden cualquiera o más de las células que tienen CACCR y CAR descritas en la presente descripción (por ejemplo, una célula, por ejemplo, una célula inmunitaria, tal como una célula T que tiene un CACCR y un

CAR de BCMA) y las composiciones farmacéuticas de estas. La presente descripción también proporciona los artículos de fabricación que comprenden una o más de las células I con CAR que tienen CACCR y CAR (por ejemplo, que tienen CAR de BCMA) descritas en la presente descripción (por ejemplo, una célula, por ejemplo, una célula inmunitaria, tal como una célula T que tiene un CACCR y un CAR de BCMA), las composiciones farmacéuticas de estas y los kits descritos en la presente descripción.

Los siguientes ejemplos se ofrecen solo con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la descripción.

Todos los documentos de patente y que no son de patente a los que se hace referencia a lo largo de esta descripción se incorporan en la presente descripción como referencia en su totalidad para todos los propósitos.

La Figura 1 muestra una representación esquemática de un receptor quimérico de citocina constitutivamente activo, modificado por ingeniería genética como se describe en la presente descripción y se usa en los siguientes ejemplos. La Figura 2 muestra las representaciones esquemáticas de los polipéptidos de colas citoplasmáticas truncadas de la descripción que son componentes del CACCR en los siguientes ejemplos. La Figura 2B, Figura 2C y Figura 2D muestran los vectores bicistronicos ilustrativos para la expresión tanto de un CACCR como de un CAR, que pueden usarse en los experimentos y los procedimientos como los descritos a continuación para la generación de las células que coexpresan un CAR y un CACCR.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Colas citoplasmáticas optimizadas derivadas de IL2Rb imitan más de cerca la señalización de IL-15, en lugar de IL-2

La IL-2 y la IL-15 son dos citocinas que emiten señales de forma natural a través de un receptor de citocina heterodimérico compuesto por la cadena gamma común y la IL2Rb. A pesar de compartir los mismos receptores nativos, la IL-2 y la IL-15 ejercen efectos diferentes sobre la diferenciación y la persistencia de las células T. Mientras que la IL-2 induce la diferenciación efectora de corta duración, la IL-15 promueve la generación de las células T de memoria de larga duración. Además, se ha demostrado que el aumento de las concentraciones séricas de IL-15 se correlaciona positivamente con la respuesta del paciente a la terapia con células T con CAR. Por tanto, se prefieren los CACCR que imitan la señalización y los efectos de IL-15, en lugar de IL-2. Se busca determinar si las colas citoplasmáticas de IL2Rb truncadas imitaban más de cerca la señalización de IL-2 o IL-15.

Con este fin, se usaron las células T con CAR que comprenden un CAR de BCMA ilustrativo que tiene el scFv de P5A2 dirigido hacia BCMA, acoplado a mimotopos de rituximab, dominios de señalización de 4-1BB y CD3z (véase la patente de los Estados Unidos núm. 10,294,304, incorporada en la presente descripción como referencia). Se generaron las células T con CAR específicos a BCMA que coexpresaban las colas de IL2Rb truncadas y se compararon sus perfiles de expresión génica con las células T con CAR de

control que se han expuesto a IL-2 o IL-15 humana recombinante exógena. Para producir los lentivirus que codifican un CACCR y CAR de BCMA, las células HEK293T se sembraron a 0,45 millones de células por ml en 2 ml de DMEM (Gibco) complementado con FBS al 10 % (Hyclone) por pocillo de una placa de 6 pocillos en el día antes de la transfección. El día

5 de la transfección, el lentivirus se preparó mediante la mezcla de vectores de empaquetamiento lentiviral 1,5 µg de psPAX2, 0,5 µg de pMD2G y 0,5 µg del vector con CAR de transferencia adecuado en 250 µl de Opti-MEM (Gibco) por pocillo de la placa de 6 pocillos ("mezcla de ADN"). Se incubaron 10 µl de lipofectamina 2000 (Invitrogen) en 250 µl de Opti-MEM a temperatura ambiente durante 5 minutos y después se añadió a la mezcla

10 de ADN. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos y el volumen total de 500 µl se añadió lentamente a los lados de los pocillos que contenían HEK-293T. Un día después de la transfección, el medio de cada pocillo de las células HEK293T en placa de 6 pocillos se reemplazó con 2 ml por pocillo del medio de transducción de las células T, es decir, X-Vivo-15 complementado con FBS al 10 %. Dos días después de la transfección, los

15 sobrenadantes lentivirales de las células HEK293T se recogieron y se pasaron a través de un filtro de 0,45 micrones (EMD Millipore) para eliminar los restos celulares, y los sobrenadantes lentivirales crudos se usaron directamente para la transducción de las células T. En el día 0, las células T purificadas se activaron en medio X-Vivo-15 (Lonza) complementado con 100 UI/ml de IL-2 humana (Miltenyi Biotec), FBS al 10 % (Hyclone) y T

20 TransAct humana (Miltenyi Biotec, Cat# 130-111-160, dilución 1:100) en una placa Grex-24 (Wilson Wolf, cat# 80192M). En el día 2, las células T se resuspendieron a 0,5 millones de células por ml en el medio de transducción de las células T, transducidas con un volumen igual de sobrenadante lentiviral crudo junto con 100 UI/ml de IL-2 humana en una placa Grex-24. En el día 5, las células T con CAR que expresan CACCR se alimentaron mediante

25 el reemplazo del medio gastado con el medio de expansión de las células T, es decir, X-Vivo-15 complementado con suero AB humano al 5 % (Gemini Bio), junto con 100 UI/ml de IL-2 humana. En este momento, las células T con CAR de control que carecen de CACCR se expandieron en 100 U/ml de IL-2 humana solamente, o 100 U/ml de IL-2 humana y 10 ng/ml de IL-15 humana (Miltenyi Biotec). Las células se expandieron en recipientes G-Rex

30 más grandes (Wilson Wolf) según fue necesario mediante el uso del medio de expansión de las células T y las concentraciones respectivas de las citocinas recombinantes. En el día 13, las células se tiñeron con el kit de viabilidad fijable Zombie NIR (Biolegend), se marcaron con un anticuerpo de CD3 conjugado con BUV395 (Biolegend) y un anticuerpo anti-idiotipo específico para el scFv de P5A2, luego se clasificaron con FACS para enriquecerlo en

35 células T CAR+. A continuación, se cultivaron las células T CAR+ clasificadas en las placas Grex-24 durante 2 días más en el medio de expansión de las células T, dejando las células T CAR+ de BCMA y CACCR en ausencia de citocinas exógenas y con las células T CAR+ de control clasificadas en ausencia de citocinas exógenas, tratadas con 100 U/ml de IL-2 humana o tratadas con 10 ng/ml de IL-15 humana. En el día 15, las células T CAR+ vivas

se enriquecieron mediante el uso del kit de eliminación de células muertas Easy Sep (StemCell Technologies), y los sedimentos celulares se congelaron rápidamente para la posterior extracción de ARN y el análisis de expresión génica NanoString (Human CAR-T Panel; NanoString Technologies). Ver la Figura 3A.

- 5 Los datos de la Figura 3B y Figura 3C muestran que las células T con CAR de BCMA y CACCR que tienen colas de IL2Rb truncadas imitan más de cerca la señalización de IL-15, en lugar de IL-2. Como ejemplo, se evaluaron el CACCR TpoR(478-582;S505N,W515K).IL2Rb(393-433,518-551) y TpoR(478-582;H499L,S505N,W515K).IL2Rb(339-379,393-433,518-551). La Figura 3A es un diagrama
- 10 esquemático del diseño experimental y el flujo de trabajo para la preparación de muestras. La Figura 3B muestra el perfil de expresión génica de las células T con CAR de BCMA y CACCR en comparación con el de las células T con CAR de control tratadas con IL-2 de los días 13-15. La Figura 3C muestra el perfil de expresión génica de las células T con CAR y CACCR en comparación con el de las células T con CAR de control tratadas con IL-15 de
- 15 los días 13 a 15. Se calculó el log2 de cambio múltiplo (FC) de cada muestra mediante la normalización para las células T con CAR de control que se dejaron sin tratar entre los días 13 y 15. Los valores de R2 y la línea de mejor ajuste (línea continua) determinados por el análisis de regresión lineal se muestran en cada gráfico. Los datos que se muestran son una representación de dos donantes. Aunque los perfiles de expresión génica de las células T
- 20 con CAR y CACCR no mostraron correlación con las muestras tratadas con IL-2 (Figura 3B), se correlacionaron positivamente con las muestras tratadas con IL-15 (Figura 3C). Estos sugieren que el CACCR que tiene las colas de IL2Rb truncadas imita más de cerca las respuestas transcripcionales y de señalización descendente de IL-15, en lugar de IL-2.

25 **Ejemplo 2: Los receptores de citocinas constitutivos mejoran la citotoxicidad in vitro de los CAR dirigidos hacia un objetivo de tumor líquido**

Los CACCR se clonaron en el constructo de CAR dirigido hacia un marcador de una neoplasia maligna hematológica (es decir, BCMA) y se evaluó la citotoxicidad a largo plazo contra la línea celular objetivo positiva para BCMA.

- Las células objetivo que expresan de manera estable los indicadores de GFP y
- 30 luciferasa de luciérnaga se generaron mediante la transducción lentiviral. Se sembraron 10 000 células objetivo marcadas con Luc-GFP en 100 ul por pocillo en una placa de cultivo de tejidos blanca de 96 pocillos de fondo plano. Las células T con CAR criopreservadas (con inactivaciones dobles de TRAC/CD52) se descongelaron, se contaron y el porcentaje de células T con CAR en todas las muestras se normalizó a la muestra con la menor eficiencia
- 35 de transducción mediante la adición de células T no transducidas (NTD). A continuación, las células T con CAR se añadieron en un volumen de 100 µl a cada pocillo de las células objetivo en las relaciones efector:objetivo (E:O) indicadas por triplicado. Como control negativo “solo objetivos”, se añadieron a las células objetivo 100 ul del medio, en lugar de las células T. Después de dos o tres días, los pocillos se mezclaron mediante pipeteo suave,

y se transfirieron 100 μ l de cada pocillo que contenía las células T a una nueva placa de cultivo de tejidos blanca de 96 pocillos de fondo plano que contenía 10 000 células objetivo marcadas con Luc-GFP recién sembradas en 100 μ l. Los pocillos de "solo objetivos" recibieron el medio fresco en lugar de las células T. La nueva placa se incubó a 37 °C, mientras que el número de células objetivo vivas que quedaban en la antigua placa de 96 pocillos se determinó mediante el uso del sistema de ensayo de luciferasa ONE-Glo (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El porcentaje de células objetivo vivas se calculó mediante la normalización de la señal de luciferasa a la de los pocillos de "solo objetivo", y el porcentaje de citotoxicidad se calculó como 100 % - % de células objetivo vivas. Se realizaron transferencias en serie a las células objetivo frescas y lecturas de luciferasa cada dos o tres días hasta que cesó toda la actividad citotóxica.

La Figura 4 muestra que los CACCR mejoraron la actividad citotóxica de las células T con CAR dirigidos hacia BCMA, un objetivo de tumor líquido. La Figura 4 muestra la citotoxicidad de un CAR de BCMA (scFv de P5A2) contra la línea celular de mieloma múltiple MM.1S en un E:O=10:1, lo que indica que la coexpresión de un CACCR en las células T con CAR de BCMA con inactivaciones dobles de TRAC/CD52 (dKO) aumentó la citotoxicidad a largo plazo de las células T con CAR. Todas las células T con CAR usadas en los siguientes ejemplos contenían el TRAC/CD52 dKO.

Ejemplo 3: Los CACCR mejoran la actividad *in vivo* de las células T con CAR

Las terapias con células T con CAR, como las que se dirigen a CD19 y BCMA, han alcanzado un éxito clínico sin precedentes en el tratamiento de las neoplasias hematológicas. Si bien se ha logrado una alta tasa de respuestas completas, esto es transitorio ya que la mayoría de los pacientes eventualmente recaen. Además, las células T con CAR han alcanzado un éxito más limitado para el tratamiento de los tumores sólidos. Entre las razones de la recaída y la falta de respuesta se encuentran la expansión y la persistencia insuficientes de las células T con CAR, así como también la inhibición funcional de las células T con CAR por microambientes inmunosupresores. Dado que nuestra caracterización *in vitro* de las células T con CAR y CACCR reveló mejoras en los perfiles de proliferación, persistencia, potencia y agotamiento controlados por el objetivo, a continuación, se investigó si estas mejoras funcionales se traducían en una mejor actividad antitumoral *in vivo*.

Para interrogar la actividad *in vivo* de las células T con CAR y CACCR en el contexto de las neoplasias hematológicas, se usó las células T con CAR con TRAC/CD52 dKO que tienen el scFv de P5A2 específico a BCMA acoplado a los dominios de señalización de 4-1BB y CD3 ζ en un modelo de xenoinjerto ortotópico de mieloma múltiple. Las células T con CAR de BCMA deficientes en el receptor de células T (TCR) se generaron mediante la inactivación mediada por nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN) para evitar la posible confusión de la xenorreactividad controlada por TCR. Los ratones NSG hembra de 8-10 semanas de edad se irradiaron con 1 Gy un día antes de la inoculación

intravenosa de 5×10^6 MM.1S-Luc-GFP. Los ratones se asignaron al azar en función de la carga tumoral 14 días después de la implantación del tumor y se dosificaron por vía intravenosa con 1×10^6 o 3×10^6 de las células T con CAR indicadas (n=10 por grupo). La progresión tumoral se controló mediante imágenes bioluminiscentes. En el día 30 después de la dosis de células T, se extrajo la sangre a los ratones que habían recibido 3×10^6 células T con CAR para el recuento de células T con CAR de BCMA en la periferia. Específicamente, 50 ul de sangre completa de cada ratón se sometieron a lisis de glóbulos rojos mediante el uso del amortiguador de lisis ACK (Gibco), se bloquearon con Fc y se tiñeron con el siguiente cóctel de anticuerpos diluido en PBS+BSA al 1 %: anti-CD45 de ratón conjugado con FITC (Biolegend), anti-CD45 humano conjugado con BV421 (Biolegend) y un anticuerpo anti-idiotipo específico para el scFv de P5A2. Finalmente, las muestras se lavaron en PBS y los sedimentos celulares se resuspendieron en 130 ul de PBS+BSA al 1 % que contenía perlas de recuento 123count eBeads (Thermo Fisher) (10 ul de perlas de recuento en 120 ul de PBS+BSA al 1 %) antes del análisis FACS.

La Figura 5A, Figura 5B y Figura 5C muestran que los CACCR mejoraron la actividad antitumoral *in vivo* y la persistencia de las células T con CAR de BCMA contra el mieloma múltiple ortotópico. La Figura 5A y Figura 5B muestran la progresión tumoral en respuesta al tratamiento con 1×10^6 o 3×10^6 de las células T con CAR indicadas, respectivamente. Aunque las células T con CAR de BCMA de control fueron capaces de mediar en la regresión inicial del tumor, esta respuesta fue de corta duración ya que los tumores recayeron 5 días después de la infusión celular. Sin embargo, las células T con CAR que coexpresan CACCR retrasaron significativamente la recaída del tumor y mejoraron la durabilidad de la respuesta. Las estadísticas en la Figura 5A y Figura 5B representan ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ en función del ANOVA de una vía con medidas repetidas con comparaciones múltiples de Tukey de los días 6-34 para la Figura 5A y los días 6-44 para la Figura 5B. La Figura 5C muestra el número de células T con CAR de BCMA presentes en la sangre periférica de los ratones tratados con 3×10^6 células T con CAR 30 días después de la infusión de células T. Coincidiendo con la recaída del tumor observada en los ratones tratados con las células T con CAR de BCMA de control, las células T con CAR de BCMA de control ya no pudieron detectarse en la periferia. Por el contrario, las células T con CAR de BCMA y CACCR que fueron superiores en la prevención de la recaída del tumor también fueron más abundantes *in vivo*. Las estadísticas en la Figura 5C representan * $p < 0,05$ y **** $p < 0,0001$ en función del ANOVA de una vía ordinario con comparaciones múltiples de Tukey. Estos sugieren que la persistencia mejorada de las células T con CAR y CACCR mediaba en parte un mayor control tumoral a largo plazo y prolongaba la durabilidad de la respuesta.

La Figura 5D y Figura 5E muestran la supervivencia a largo plazo de los ratones que habían recibido 1×10^6 o 3×10^6 células T con CAR, respectivamente. En ambas dosis de células T con CAR, las células T con CAR de BCMA que tienen el CACCR TpoR(478-

582;H499L,S505N,W515K).IL2Rb(339-379,393-433,528-551) prolongaron dramáticamente la supervivencia general.

Ejemplo 4: Evaluar los CACCR para las células T con CAR de BCMA

La naturaleza modular de los CACCR proporciona la flexibilidad de fusionar los dominios de señalización derivados de diferentes receptores de citocinas de interés. Entre estos, IL-7, IL-2 e IL-15 tienen papeles bien establecidos en la promoción de la supervivencia, la expansión y la función efectora de las células T. Por lo tanto, se planteó la hipótesis de que las células T con CAR de BCMA pueden beneficiarse funcionalmente de los CACCR que tienen los dominios de señalización IL7Ra o IL2/15Rb, y se buscó identificar cuál de estos CACCR, en su caso, podría proporcionar la mayor mejora a las células T con CAR de BCMA.

Se generaron células objetivo MM.1S o Molp8 que expresan BCMA que expresan de manera estable los indicadores de GFP y luciferasa de luciérnaga mediante la transducción lentiviral. Se sembraron 10 000 células objetivo marcadas con Luc-GFP en 100 ul por pocillo en una placa de cultivo de tejidos blanca de 96 pocillos de fondo plano. Las células T con CAR TRAC/CD52 dKO criopreservadas se descongelaron, se contaron y el porcentaje de células T con CAR en todas las muestras se normalizó a la muestra con la menor eficiencia de transducción mediante la adición de células T no transducidas (NTD). A continuación, las células T con CAR se añadieron en un volumen de 100 ul a cada pocillo de células objetivo a una E:O=10:1 o 3:1 por triplicado. Como control negativo "solo objetivos", se añadieron a las células objetivo 100 ul del medio, en lugar de las células T. Después de dos o tres días, los pocillos se mezclaron mediante pipeteo suave, y se transfirieron 100 ul de cada pocillo que contenía las células T a una nueva placa de cultivo de tejidos blanca de 96 pocillos de fondo plano que contenía 10 000 células objetivo marcadas con Luc-GFP recién sembradas en 100 ul. Los pocillos de "solo objetivos" recibieron el medio fresco en lugar de las células T. La nueva placa se incubó a 37 °C, mientras que el número de células objetivo vivas que quedaban en la antigua placa de 96 pocillos se determinó mediante el uso del sistema de ensayo de luciferasa ONE-Glo (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El porcentaje de células objetivo vivas se calculó mediante la normalización de la señal de luciferasa a la de los pocillos de "solo objetivo", y el porcentaje de citotoxicidad se calculó como 100 % - % de células objetivo vivas. Se realizaron transferencias en serie a las células objetivo frescas y lecturas de luciferasa cada dos o tres días hasta que cesó toda la actividad citotóxica.

La Figura 6 muestra el cribado funcional de las células T con CAR de BCMA y CACCR TRAC/CD52 dKO que tienen los CACCR indicados mediante el uso de un ensayo de destrucción en serie *in vitro*. Se usaron dos líneas celulares objetivo que expresan niveles variables de BCMA endógeno: MM.1S-Luc-GFP de expresión moderada (línea celular de alta expresión de BCMA) y Molp8-Luc-GFP de baja expresión (línea celular de baja expresión de BCMA). La Figura 6A muestra un esquema del constructo lentiviral bicistrónico CAR de BCMA y CACCR. El constructo de CAR de BCMA que contiene el clon scFv de

P5A2 y R2 se usó en todo este ejemplo. El CACCR se clonó secuencia abajo del promotor de EF1a y secuencia arriba de un CAR de BCMA de 2^{da} generación. Se incluyó una secuencia WPRE de tipo salvaje para estabilizar la expresión de la transcripción. La Figura 6B y Figura 6C muestran la actividad de destrucción en serie de los CAR de BCMA y CACCR que tienen CACCR derivados de IL2Rb contra MM.1S-Luc-GFP y Molp8-Luc-GFP, respectivamente. Todos los CACCR derivados de IL2Rb probados mejoraron la actividad de las células T con CAR de BCMA, y el CACCR TpoR(478-582;H499L,S505N,W515K).IL2Rb(339-379,393-433,528-551) confirió la mayor mejora. La Figura 6D y Figura 6E muestran la actividad de destrucción en serie de CAR de BCMA y CACCR que tiene el CACCR derivado de IL2Rb más activo y un CACCR que tiene IL7Ra. A diferencia del CACCR derivado de IL2Rb, el CACCR que tiene IL7Ra no potenció la actividad de las células T con CAR de BCMA en ninguna de las líneas celulares objetivo.

Para evaluar la actividad antitumoral *in vivo* de los CAR de BCMA y CACCR, se usó un modelo de xenoinjerto ortotópico de mieloma múltiple en el que la enfermedad se establece inicialmente en la médula ósea y la recaída se produce posteriormente en los sitios extramedulares. Brevemente, los ratones NSG hembra de 8-10 semanas de edad se irradiaron con 1 Gy un día antes de la inoculación intravenosa de 5×10^6 MM.1S-Luc-GFP. Los ratones se asignaron al azar en función de la carga tumoral 15 días después de la implantación del tumor y se infundieron por vía intravenosa las cantidades indicadas de células T con CAR de BCMA y CACCR TRAC/CD52 dKO por ratón (n=10 ratones por grupo). A partir de entonces, se controló la carga tumoral dos veces por semana mediante imágenes bioluminiscentes.

La Figura 7 muestra la actividad antitumoral de 5×10^6 células T con CAR de BCMA y CACCR que tienen un CACCR derivado de IL7Ra o IL2Rb en relación con el CAR de BCMA sin modificar. La Figura 7A muestra la progresión tumoral de cada grupo. En la condición experimental, aunque las células T con CAR de BCMA sin modificar pudieron mediar en la regresión inicial del tumor, la enfermedad finalmente recayó. El CACCR derivado de IL7Ra no mejoró la actividad de las células T con CAR de BCMA. Mientras que el CACCR TpoR(478-582;H499L,S505N,W515K).IL2Rb(339-379,393-433,528-551) mostró cierto retraso en la recaída del tumor, el CACCR TpoR(478-582;H499L,S505N,W515K).IL2Rb(339-379,393-433,528-551) proporcionó la respuesta más duradera. El rendimiento *in vivo* de estos CACCR corroboró el orden de clasificación de la actividad *in vitro* en la Figura 6. El gráfico muestra la media $\pm$ sem; *p<0,05 y *p<0,001 en función del ANOVA de una vía RM con las comparaciones múltiples de Tukey de los días 6-48. La Figura 7B muestra la respuesta de los ratones individuales en cada grupo. Los ratones que habían recibido las células T con CAR de BCMA sin modificar respondieron inicialmente de manera no uniforme y, finalmente, todos recayeron con tumores extramedulares. Por el contrario, los ratones que habían recibido los CAR de BCMA y CACCR que tienen el CACCR TpoR(478-582;H499L,S505N,W515K).IL2Rb(339-379,393-433,528-551) respondieron de

manera uniforme inicialmente y mostraron respuestas duraderas a largo plazo con 9/10 ratones que permanecieron sin tumores al final del estudio.

La Figura 8 muestra las actividades antitumorales de dos CACCR derivados de IL2Rb en relación con el CAR de BCMA sin modificar a una dosis de 1×10^6 o 3×10^6 , todos

5 TRAC/CD52 dKO. Se probaron diez ratones NSG hembra por grupo. Cada ratón recibió 5×10^6 células MM.1S luc2 GFP. La Figura 8A muestra la supervivencia general de los ratones que recibieron una dosis baja de 1×10^6 células T con CAR. Mientras que el CACCR TpoR(478-582;S505N,W515K).IL2Rb(393-433,528-551) no tuvo ningún efecto sobre la supervivencia general en relación con las células T con CAR de BCMA sin modificar, el

10 CACCR TpoR(478-582;H499L,S505N,W515K). IL2Rb(339-379,393-433,528-551) prolongó drásticamente la supervivencia general. La Figura 8B muestra la progresión tumoral de los ratones que habían recibido 3×10^6 células T con CAR. Aunque todos los grupos sufrieron una regresión inicial del tumor, los ratones que habían recibido las células T con CAR de BCMA sin modificar recayeron rápidamente. Ambos CACCR pudieron retrasar la recaída,

15 con el CACCR TpoR(478-582;H499L,S505N,W515K).IL2Rb(339-379,393-433,528-551) resultó en la respuesta más duradera. La Figura 8C muestra la respuesta de los ratones individuales que habían recibido 3×10^6 células T con CAR. En comparación con 1/10 ratones sin tumor en el grupo tratado con T con CAR de BCMA sin modificar, las células T con CAR de BCMA que coexpresan el CACCR TpoR(478-582;H499L,S505N,W515K).IL2Rb(339-

20 379,393-433,528-551) mediaron la eliminación del tumor en 5/10 ratones al final del estudio. Tomados en conjunto, estos datos demuestran que entre los CACCR derivados de IL7Ra e IL2Rb probados, el CACCR TpoR(478-582;H499L,S505N,W515K). IL2Rb(339-433,528-551) confirió la mayor mejora a las células T con CAR de BCMA.

Ejemplo 5: Capacidad de fabricación y actividad funcional de CAR de BCMA y CACCR

25 Las células T con CAR se generan comúnmente mediante el suministro de genes basados en virus, lo que impone un límite superior al tamaño de la carga del vector. Si bien la coexpresión de las modificaciones adicionales con un CAR en el mismo vector puede mejorar la actividad de las células T con CAR, aumentar el tamaño de la carga puede comprometer la eficiencia de la transducción y la capacidad de fabricación del producto. A

30 continuación, se examinó la actividad funcional y el rendimiento de las células T CAR⁺ de varios CAR de BCMA y CACCR y se compararon con los de su contraparte sin modificar.

Las células T con CAR de BCMA se generaron como sigue. Para producir los lentivirus que codifican los CAR de BCMA, se sembraron las células HEK-293T a 0,45 millones de células por ml en 2 ml de DMEM (Gibco) complementado con FBS al 10 %

35 (Hyclone) por pocillo de una placa de 6 pocillos el día antes de la transfección. El día de la transfección, el lentivirus se preparó mediante la mezcla de vectores de empaquetamiento lentiviral 1,5 µg de psPAX2, 0,5 µg de pMD2G y 0,5 µg del vector con CAR de transferencia adecuado en 250 µl de Opti-MEM (Gibco) por pocillo de la placa de 6 pocillos ("mezcla de ADN"). Se incubaron 10 µl de lipofectamina 2000 (Invitrogen) en 250 µl de Opti-MEM a

temperatura ambiente durante 5 minutos y después se añadió a la mezcla de ADN. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos y el volumen total de 500 μ l se añadió lentamente a los lados de los pocillos que contenían HEK-293T. 1 día después de la transfección, el medio de cada pocillo de las células HEK293T en la placa de 6 pocillos se reemplazó con 2 ml por pocillo del medio de transducción de las células T, es decir, X-Vivo-15 complementado con FBS al 10 %. 2 días después de la transfección, se recogieron los sobrenadantes lentivirales de las células HEK293T y se pasaron a través de un filtro de 0,45 micrones (EMD Millipore) para eliminar los restos celulares, y los sobrenadantes lentivirales crudos se usaron directamente para la transducción de las células T. En el día 0, las células T purificadas se activaron en medio X-Vivo-15 (Lonza) complementado con 100 UI/ml de IL-2 humana (Miltenyi Biotec), FBS al 10 % (Hyclone) y T TransAct humana (Miltenyi Biotec, Cat# 130-111-160, dilución 1:100) en una placa Grex-24 (Wilson Wolf, cat# 80192M). El día 2, las células T se resuspendieron a 0,5 millones de células por ml en el medio de transducción de las células T, transducidas con un volumen igual de sobrenadante lentiviral crudo junto con 100 UI/ml de IL-2 humana en una placa Grex-24. El día 5, las células se alimentaron mediante el reemplazo del medio gastado con el medio de expansión de las células T, es decir, X-Vivo-15 complementado con suero AB humano al 5 % (Gemini Bio), junto con 100 UI/ml de IL-2 humana. El día 6, el TCR α constante (TRAC) y los genes CD52 se inactivaron por la edición de genes mediada por nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN). Véase, por ejemplo, el documento núm. US2016/0145337. Las células se expandieron en recipientes G-Rex más grandes (Wilson Wolf) según fue necesario mediante el uso del medio de expansión de las células T y 100 UI/ml de IL-2 humana. El día 14, las células TCR α /b⁻ se purificaron mediante el uso del kit de reducción EasySep Human TCR α /b (Stem Cell Technologies) y se dejaron reposar durante la noche en el medio de expansión de las células T y 100 UI/ml de IL-2 humana antes de la criopreservación el día 15. En los días 5 y 15, se determinó la positividad de CAR por citometría de flujo mediante el uso de un anticuerpo anti-idiotipo conjugado con PE para la detección del scFv de P5A2.

La Figura 9 muestra la capacidad de fabricación y el rendimiento de las células T que tienen CAR de BCMA y CACCR transducidas en un constructo lentiviral. La Figura 9A muestra un esquema de un constructo lentiviral CAR de BCMA y CACCR, en la que el promotor de EF1a fuerte dirige la expresión tanto del CACCR como del CAR de BCMA a partir de un marco de lectura abierto bicistrónico y la expresión del transcrito se estabiliza mediante la secuencia WPRE de tipo salvaje (wt, por sus siglas en inglés). La Figura 9B muestra la eficiencia de transducción inicial en el día 5 (3 días después de la transducción) y el día 15 (último día) del proceso de producción de las células T con CAR. Como se esperaba, CAR de BCMA y CACCR transducen de manera menos eficiente el día 5 debido a su mayor tamaño de carga. Sin embargo, los CACCR confieren a los CAR de BCMA y CACCR una ventaja proliferativa, lo que permite que las células T con CAR de BCMA⁺ y

CACCR se enriquezcan más rápido y alcancen niveles comparables de positividad para el CAR al final de la producción el día 15. La Figura 9C muestra que el rendimiento de las células T con CAR⁺ de BCMA y CACCR es igual o mayor que el de las células T con CAR⁺ de BCMA sin modificar. El rendimiento se define por el número final de células T con CAR⁺ obtenidas al final de la producción por millón de material de partida de células pan-T en el día 0 de la producción. Los datos de la Figura 9B y Figura 9C muestran la media±sem de 3 donantes. Aunque los CAR de BCMA y CACCR tienen un tamaño de carga más grande, su menor eficiencia de transducción inicial de los CAR de BCMA y CACCR se vio compensada por su enriquecimiento más rápido durante el curso de la producción, lo que les permite conservar una capacidad de fabricación comparable a la de sus contrapartes sin modificar.

Se ha informado que el WPRE de tipo salvaje puede codificar una proteína X truncada que puede representar un riesgo oncogénico. Para mitigar este riesgo de seguridad, el WPRE de tipo salvaje puede mutarse (por ejemplo, por la inactivación del codón de inicio) para anular la expresión de la proteína X. Como el vector lentiviral CAR de BCMA y CACCR inicialmente probado contenía la secuencia WPRE de tipo salvaje, se buscó determinar si la sustitución de la secuencia mutante afectaría la expresión y la funcionalidad de CAR de BCMA y CACCR.

Las células T con CAR de BCMA se generaron como sigue. Para producir los lentivirus que codifican los CAR de BCMA, se sembraron las células HEK-293T a 0,45 millones de células por ml en 2 ml de DMEM (Gibco) complementado con FBS al 10 % (Hyclone) por pocillo de una placa de 6 pocillos el día antes de la transfección. El día de la transfección, el lentivirus se preparó mediante la mezcla de vectores de empaquetamiento lentiviral 1,5 µg de psPAX2, 0,5 µg de pMD2G y 0,5 µg del vector con CAR de transferencia adecuado en 250 µl de Opti-MEM (Gibco) por pocillo de la placa de 6 pocillos ("mezcla de ADN"). Se incubaron 10 µl de lipofectamina 2000 (Invitrogen) en 250 µl de Opti-MEM a temperatura ambiente durante 5 minutos y después se añadió a la mezcla de ADN. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos y el volumen total de 500 µl se añadió lentamente a los lados de los pocillos que contenían HEK-293T. Un día después de la transfección, el medio de cada pocillo de las células HEK293T en placa de 6 pocillos se reemplazó con 2 ml por pocillo del medio de transducción de las células T, es decir, X-Vivo-15 complementado con FBS al 10 %. 2 días después de la transfección, se recogieron los sobrenadantes lentivirales de las células HEK293T y se pasaron a través de un filtro de 0,45 micrones (EMD Millipore) para eliminar los restos celulares, y los sobrenadantes lentivirales crudos se usaron directamente para la transducción de las células T. En el día 0, las células T purificadas se activaron en medio X-Vivo-15 (Lonza) complementado con 100 UI/ml de IL-2 humana (Miltenyi Biotec), FBS al 10 % (Hyclone) y T TransAct humana (Miltenyi Biotec, Cat# 130-111-160, dilución 1:100) en una placa Grex-24 (Wilson Wolf, cat# 80192M). El día 2, las células T se resuspendieron a 0,5 millones de células por ml en el medio de transducción de las células T, transducidas con un volumen igual de sobrenadante lentiviral

crudo junto con 100 UI/ml de IL-2 humana en una placa Grex-24. El día 5, las células se alimentaron mediante el reemplazo del medio gastado con el medio de expansión de las células T, es decir, X-Vivo-15 complementado con suero AB humano al 5 % (Gemini Bio), junto con 100 UI/ml de IL-2 humana. El día 6, el TCRa constante (TRAC) y los genes CD52

5 se inactivaron por la edición de genes mediada por nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN). Las células se expandieron en recipientes G-Rex más grandes (Wilson Wolf) según fue necesario mediante el uso del medio de expansión de las células T y 100 UI/ml de IL-2 humana. El día 14, las células TCRa/b⁺ se purificaron mediante el uso del kit de reducción EasySep Human TCRa/b (Stem Cell Technologies) y se dejaron reposar

10 durante la noche en el medio de expansión de las células T y 100 UI/ml de IL-2 humana antes de la criopreservación el día 15. En los días 5 y 15, se determinó la positividad de CAR por citometría de flujo mediante el uso de un anticuerpo anti-idiotipo conjugado con PE para la detección del scFv de P5A2.

La citotoxicidad *in vitro* de las células T con CAR de BCMA se evaluó en un ensayo

15 de destrucción en serie como sigue. Se generaron células objetivo MM.1S o Molp8 que expresan BCMA que expresan de manera estable los indicadores de GFP y luciferasa de luciérnaga mediante la transducción lentiviral. Se sembraron 10 000 células objetivo marcadas con Luc-GFP en 100 ul por pocillo en una placa de cultivo de tejidos blanca de 96 pocillos de fondo plano. Las células T con CAR TRAC/CD52 dKO criopreservadas se

20 descongelaron, se contaron y el porcentaje de células T con CAR en todas las muestras se normalizó a la muestra con la menor eficiencia de transducción mediante la adición de células T no transducidas (NTD). A continuación, las células T con CAR se añadieron en un volumen de 100 ul a cada pocillo de las células objetivo a una E:O=3:1 por triplicado. Como control negativo "solo objetivos", se añadieron a las células objetivo 100 ul del medio, en

25 lugar de las células T. Después de dos o tres días, los pocillos se mezclaron mediante un pipeteado suave, y se transfirieron 100 ul de cada pocillo que contenía las células T a una nueva placa de cultivo de tejidos blanca de 96 pocillos de fondo plano que contenía 10 000 células objetivo marcadas con Luc-GFP recién sembradas en 100 ul. Los pocillos de "solo objetivos" recibieron el medio fresco en lugar de las células T. La nueva placa se incubó a

30 37 °C, mientras que el número de células objetivo vivas que quedaban en la antigua placa de 96 pocillos se determinó mediante el uso del sistema de ensayo de luciferasa ONE-Glo (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El porcentaje de células objetivo vivas se calculó mediante la normalización de la señal de luciferasa a la de los pocillos de "solo objetivo", y el porcentaje de citotoxicidad se calculó como 100 % - % de células objetivo

35 vivas. Se realizaron transferencias en serie a las células objetivo frescas y lecturas de luciferasa cada dos o tres días hasta que cesó toda la actividad citotóxica.

La Figura 10 muestra los efectos de la sustitución de la secuencia WPRE mutante (mut) sobre la capacidad de fabricación y la función de las células T con CAR de BCMA y CACCR. La Figura 10A muestra un esquema para los vectores usados con las secuencias

WPRES de tipo salvaje o mutante. La Figura 10B muestra la positividad de CAR inicial y final de los CAR de BCMA y CACCR. La eficiencia de transducción de CAR de BCMA y CACCR (día 5) y el enriquecimiento (día 15) no se afectaron por el cambio a mutWPRES. La Figura 10C muestra que el rendimiento final de CAR⁺ de los CAR de BCMA y CACCR no se afectó por el cambio a mutWPRES. La Figura 10D muestra que, aunque las células T con CAR de BCMA y CACCR tenían una expresión de CAR más baja que su contraparte sin modificar, los niveles de expresión de CAR en las células T con CAR de BCMA y CACCR no se afectaron por el cambio a mutWPRES. Los datos de la Figura 10B, Figura 10C y Figura 10D muestran la media±sem de 3 donantes. La Figura 10E muestra la actividad de destrucción en serie *in vitro* de los CAR de BCMA y CACCR contra las líneas celulares MM.1S-Luc-GFP y Molp8-Luc-GFP. En comparación con las células T con CAR de BCMA sin modificar, las células T con CAR de BCMA y CACCR que tienen el WPRES de tipo salvaje o el mutante mostraron una actividad de destrucción en serie mejorada, lo que demuestra que el cambio a mutWPRES no altera la función CAR de BCMA y CACCR. Los datos que se muestran son la media±sem de uno de cada dos donantes que arrojaron resultados similares.

La destrucción en serie se realizó mediante el uso de las células T con CAR TRAC/CD52 dKO basadas en PBMC a una E:O=10:1. La actividad de destrucción en serie mejorada se mantuvo en las células T con CAR de BCMA y CACCR derivadas de PBMC. Véase la Figura 10F. Los datos mostrados representan la media±sem de 3 donantes.

Como se muestra en la Figura 9, las eficiencias de transducción iniciales más bajas de los CAR de BCMA y CACCR se compensaron por el enriquecimiento más rápido y la ventaja de crecimiento de las células T con CAR transducidas, lo que dio como resultado rendimientos comparables de las células T con CAR a los de las células T con CAR sin modificar. Sin embargo, se buscó mejorar aún más las eficiencias y los rendimientos de transducción de las células T con CAR de BCMA y CACCR mediante la exploración de diseños de vectores alternativos que redujeran el tamaño de la carga, al mismo tiempo, manteniendo las mejoras funcionales del CAR de BCMA y CACCR. Al comparar los rendimientos y la actividad funcional con los vectores originales mostrados en la Figura 10A, se examinaron tres diseños de vector: (i) un vector controlado por EF1a sin la secuencia 3' WPRES, (ii) un vector controlado por el promotor mínimo EF1a (corto), y (iii) un vector controlado por el promotor MND (promotor con sitio de unión a cebador dl587rev sustituido, con región de control negativo eliminada, potenciador del virus del sarcoma mieloproliferativo).

Las células T con CAR de BCMA y CACCR TRAC/CD52 dKO se generaron y se caracterizaron como se describió previamente.

Para evaluar la señalización de CACCR, las células T con CAR de BCMA y CACCR al final del proceso de producción se privaron de suero en 100 μ l de RPMI sin suero (Corning) durante 4 horas en una incubadora humidificada a 37 °C con 5 % de CO₂. Como control positivo, se añadió IL-2 humana recombinante exógena (10 ng/ml; Miltenyi) a las células T

con CAR sin modificar durante los últimos 30 minutos de la privación de suero de 4 horas. Después de 4 horas, se añadió a las células un cóctel de anticuerpos que comprendía anti-CD3 humano conjugado con BUV395 (Biolegend) y anticuerpo monoclonal de marcaje v5 conjugado con FITC (Thermo Fisher) y se dejó incubar durante los 20 minutos finales. A

5 continuación, las células se fijaron mediante la adición de 35 μ l de paraformaldehído al 16 % a cada muestra de 100 μ l y se dejaron incubar durante 15 minutos a 37 °C. A continuación, las células se lavaron tres veces con PBS y se permeabilizaron en metanol frío al 100 % durante 1 o 2 noches a -20 °C. El día del análisis FACS, las células se lavaron tres veces

10 con PBS, se bloquearon con Fc y se tiñeron con anti-Stat5 de ratón/humano conjugado con AlexaFluor647 (pY694) (BD Biosciences) diluido en PBS+BSA al 1 %. Después de una hora de incubación a temperatura ambiente en la oscuridad, las células se lavaron tres veces antes del análisis FACS.

Los ensayos de destrucción en serie se realizaron a las relaciones E:O indicadas como se describió previamente.

15 En algunos casos, la actividad antitumoral *in vivo* se evaluó mediante el uso de un modelo ortotópico de mieloma múltiple. Los ratones NSG hembra de 8-10 semanas de edad se irradiaron con 1 Gy un día antes de la inoculación intravenosa de 5×10^6 MM.1S-Luc-GFP. Los ratones se asignaron al azar en función de la carga tumoral 14 días después de la implantación del tumor, y se dosificaron por vía intravenosa con 3×10^6 de las células T con

20 CAR indicadas (n=10 por grupo). La progresión tumoral se controló mediante imágenes bioluminiscentes.

La Figura 11 muestra los efectos de la eliminación de WPRE del vector original. La Figura 11A es un esquema de los vectores con CAR de BCMA y CACCR usados. La Figura 11B y Figura 11C muestran la positividad de CAR final y los rendimientos de CAR⁺,

25 respectivamente, de los constructos indicados. A pesar de una reducción de carga vectorial, la eliminación de WPRE no mejoró significativamente el porcentaje o el rendimiento final de CAR de BCMA y CACCR. La Figura 11C y Figura 11D muestran el nivel de expresión de CAR y la fuerza de señalización de CACCR determinada por la intensidad de la tinción de pSTAT5, respectivamente. La eliminación de WPRE no redujo la expresión de CAR o la

30 fuerza de señalización de CACCR en el producto de las células T con CAR de BCMA y CACCR en reposo. Los datos de la Figura 11B, Figura 11C y Figura 11D muestran la media $\pm$ sem de 3 donantes. La Figura 11F, Figura 11G y Figura 11H muestran la actividad de destrucción en serie de tres CAR de BCMA y CACCR derivados de IL2Rb diferentes con o sin WPRE. Mientras que la citotoxicidad de los CACCR TpoR(478-582;S505N,W515K).

35 IL2Rb(393-433,528-551) (Figura 11F) y TpoR(478-582;H499L,S505N,W515K). IL2Rb(393-433,528-551) se redujeron ligeramente con la eliminación de WPRE, el CACCR TpoR(478-582; H499L, S505N, W515K).IL2Rb (339-379,393-433,528-551) más activo no se afectó por la eliminación de WPRE. Los datos de la Figura 11F, Figura G y Figura 11H muestran la media $\pm$ sem de uno de cada dos donantes que arrojaron resultados similares.

La Figura 12 muestra los efectos de sustituir el promotor de EF1a de longitud completa (FL, por sus siglas en inglés) por el promotor de EF1a mínimo (corto) (S, por su sigla en inglés) más débil. La Figura 12A es un esquema de los vectores CAR de BCMA y CACCR usados. La Figura 12B muestra la positividad de CAR final de los constructos indicados controlados por los promotores EF1a de longitud completa (FL) o corto (S). El uso del promotor de EF1a más pequeño (corto) mejoró la eficiencia de la transducción general y el porcentaje de CAR final para las células T con CAR de BCMA y CACCR y sin modificar. La Figura 12C y Figura 12D muestran la actividad de destrucción en serie de las células T con CAR controlados por el promotor de EF1a o EF1a (corto) contra las células objetivo MM.1S-Luc-GFP y Molp8-Luc-GFP, respectivamente. Si bien la sustitución por el promotor de EF1a (corto) no afectó la actividad de las células T con CAR de BCMA sin modificar, las células T con CAR de BCMA y CACCR controlados por EF1a (corto) fueron menos eficaces que sus contrapartes controlados por EF1a (longitud completa). Aunque los constructos con el promotor de EF1a (corto) mejoraron la capacidad de fabricación de CAR de BCMA y CACCR, la pérdida acompañante en la actividad de CAR de BCMA y CACCR socavó el uso adicional de los constructos CAR CACCR EF1a (corto). Los datos que se muestran son de un donante representativo.

La Figura 13 muestra los efectos de sustituir el promotor de EF1a de longitud completa (FL) por el promotor MND. La Figura 13A es un esquema de los vectores CAR de BCMA y CACCR usados. La Figura 13B y Figura 13C muestran la positividad de CAR final y el rendimiento de los constructos indicados controlados por los promotores EF1a o MND. El uso del promotor MND más pequeño mejoró la eficiencia de la transducción general, el porcentaje de CAR final y el rendimiento de las células T con CAR de BCMA y CACCR. La Figura 13D muestra el nivel de expresión de CAR. Las células T con CAR de BCMA y CACCR controladas por el promotor MND tienen una expresión CAR más alta, lo que sugiere que el promotor MND es más fuerte que el promotor de EF1a. Los datos de la Figura 13B, Figura 13C y Figura 13D muestran la media $\pm$ sd de 2 donantes. La Figura 13E y Figura 13F muestran la actividad de destrucción en serie de las células T con CAR controladas por el promotor de EF1a o MND contra MM.1S-Luc-GFP y Molp8-Luc-GFP. La Figura 13E muestra que la actividad del CACCR TpoR(478-582;H499L,S505N,W515K).IL2Rb(339-379,393-433,528-551) se redujo cuando se controló por el promotor MND. Esto se corroboró con un CACCR alternativo en la Figura 13F, donde la sustitución por el promotor MND anuló la mejora por el CACCR TpoR(478-582;S505N,W515K).IL2Rb(393-433,528-551). Los datos de la Figura 13E y Figura 13F muestran la media $\pm$ sem de uno de cada dos donantes que arrojaron resultados similares. La Figura 13G muestra la actividad antitumoral *in vivo* de los CAR de BCMA y CACCR controlados por el promotor de EF1a o MND. En comparación con las células T con CAR de BCMA y CACCR controladas por EF1a que mejoraron la eficacia antitumoral, la sustitución por el promotor MND anuló todas las mejoras funcionales. Los

datos de la Figura 13G muestran la media $\pm$ sem; ***p<0,01 y ****p<0,0001 en función del ANOVA de una vía RM con las comparaciones múltiples de Tukey de los días 5-48.

Tomados en conjunto, el formato del vector original de EF1a-TpoR(478-582;H499L,S505N,W515K).IL2Rb(339-379,393-433,528-551)-BCMA CAR.WPRE siguió
 5 siendo el más funcionalmente activo mientras conservaba una capacidad de fabricación comparable a su contraparte CAR de BCMA sin modificar. Dado que el uso de WPRE de tipo salvaje o mutante no afectó la actividad de CAR de BCMA y CACCR (Figura 10) y mutWPRE mitiga los riesgos de seguridad potenciales asociados con la expresión de la proteína X, EF1a-TpoR(478-582;H499L,S505N,W515K).IL2Rb(339-379,393-433,528-551)-
 10 BCMA CAR.mutWPRE se seleccionó para estudios adicionales.

Ejemplo 6: Caracterización funcional de la potencia y la persistencia de los CAR de BCMA y CACCR

Para dilucidar los mecanismos por los cuales los CAR de BCMA y CACCR mejoran la actividad de las células T con CAR, se caracterizó la función y el fenotipo de las células T
 15 con CAR de BCMA y CACCR después de la exposición repetida al objetivo *in vitro*.

Las células T con CAR TRAC/CD52 dKO se generaron como se describió previamente. El día 0 del ensayo, las células T con CAR TRAC/CD52 dKO criopreservadas se descongelaron, y el porcentaje de las células T con CAR en todas las muestras se normalizó a la muestra con la eficiencia de transducción más baja mediante la adición de las
 20 células T no transducidas (NTD). Se sembraron 3×10^5 células T CAR+ y 1×10^5 células objetivo MM.1S-Luc-GFP a una E:O de 3:1 en un volumen total de 750 μ l por pocillo en una placa de cultivo de tejidos de 48 pocillos. Se prepararon pocillos duplicados para cada condición. Como comparador, se añadieron 10 ng/ml de IL-15 humana recombinante (Miltenyi) a los cocultivos de las células T con CAR sin modificar y las células objetivo. A
 25 partir de entonces, cada 2 o 3 días, los pocillos se mezclaron minuciosamente mediante un pipeteo suave y se extrajeron 200 μ l de cada pocillo para desecharlos o usarlos para el análisis por citometría de flujo como se describe a continuación. Los pocillos después se repusieron con 2×10^5 células objetivo frescas MM.1S-Luc-GFP en un volumen de 200 μ l. En los pocillos tratados con IL-15, se repusieron 10 ng/ml de IL-15 humana recombinante dos
 30 veces por semana.

Para evaluar la expansión de las células T con CAR y la diferenciación de las células T de memoria, se extrajeron 200 μ l de cada pocillo de la placa de 48 pocillos y se volvieron a sembrar en un pocillo de una placa de fondo en U de 96 pocillos. Las células se lavaron con PBS y se tiñeron con el kit de viabilidad fijable Zombie-NIR (Biolegend). A continuación,
 35 las células se lavaron con PBS, se bloquearon con Fc y se tiñeron con un anticuerpo anti-idiotipo conjugado con PE para la detección de scFv de P5A2, anti-CD4 humano conjugado con BV605 (Biolegend), anti-CD8 humano conjugado con BV510 (Biolegend), anti-CD62L humano conjugado con PE/Cy7 (Biolegend) y anti-CD45RO humano conjugado con BV785 diluido en PBS+BSA al 1 %. Después del lavado, las células se resuspendieron en 100 μ l

de PBS+BSA al 1 % que contenían perlas de recuento 123count eBeads (Thermo Fisher) (10 ul de perlas de recuento en 90 ul de PBS+BSA al 1 %) antes del análisis por citometría de flujo.

5 Para evaluar la muerte celular inducida por activación (AICD), se extrajeron 200 ul de cada pocillo de la placa de 48 pocillos y se volvieron a sembrar en dos pocillos de una placa de fondo en U de 96 pocillos a 100 ul por pocillo. Se añadieron 1×10^5 células objetivos MM.1S-Luc-GFP en un volumen de 100 ul a uno de estos pocillos en la placa de 96 pocillos de fondo en U, mientras que el otro se dejó sin estimular como una comparación de referencia. Después de 4 horas, se determinaron los porcentajes de células T con CAR muertas por citometría de flujo. Brevemente, las células se lavaron con PBS y se tiñeron con el kit de viabilidad fijable Zombie-NIR (Biolegend). A continuación, las células se lavaron con PBS, se bloquearon con Fc y se tiñeron con un anticuerpo anti-idiotipo conjugado con PE para la detección de scFv de P5A2, anti-CD4 humano conjugado con BV605 (Biolegend) y anti-CD8 humano conjugado con BV510 (Biolegend) diluido en PBS+BSA al 1 %.

15 Para la tinción de citocinas intracelulares, se extrajeron 200 ul de cada pocillo de la placa de 48 pocillos y se volvieron a sembrar 100 ul en un pocillo de una placa de fondo en U de 96 pocillos. Se añadieron 1×10^5 células objetivos MM.1S-Luc-GFP en un volumen de 100 ul a uno de estos pocillos en la placa de 96 pocillos de fondo en U, junto con un cóctel inhibidor de proteína de transporte (Invitrogen). Después de 4 horas, las células se tiñeron en busca de marcadores de superficie y citocinas intracelulares. Brevemente, las células se lavaron con PBS y se tiñeron con el kit de viabilidad fijable Zombie-NIR (Biolegend). A continuación, las células se lavaron con PBS, se bloquearon con Fc y se tiñeron con un anticuerpo anti-idiotipo conjugado con PE para la detección de scFv de P5A2, anti-CD4 humano conjugado con BV605 (Biolegend) y anti-CD8 humano conjugado con BV510 (Biolegend) diluido en PBS+BSA al 1 %. Después del lavado, las células se fijaron y se permeabilizaron mediante el uso del kit BD Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se tiñeron con un anti-IFN γ humano conjugado con PE/Cy7 (Biolegend), anti-TNF α humano conjugado con BV785 (Biolegend) y anti-IL-2 humana conjugada con PE/Dazzle594 (Biolegend) antes del análisis por citometría de flujo.

30 La Figura 14 muestra la expansión de las células T con CAR después de exposiciones repetidas al objetivo en dos donantes. Los recuadros mostrados son perfiles de expansión de las células T con CAR durante los primeros 15 días del ensayo. En ambos donantes, el CAR de BCMA y CACCR (EF1a-TpoR(478-582;H499L,S505N,W515K).IL2Rb(339-379,393-433,528-551)-BCMA CAR_mutWPRE) demostró la mayor capacidad de expansión controlada por el objetivo. Los datos se presentan como media $\pm$ sem.

La Figura 15 muestra la sensibilidad de las células T con CAR a AICD con una exposición creciente a las células objetivo. La Figura 15A muestra que las células T con CAR que se sometieron a una ronda previa de exposición al objetivo (el día 0) eran

comparativamente sensibles a AICD después de una segunda exposición al objetivo, independientemente de la expresión de CACCR o el tratamiento con IL-15. La Figura 15B muestra que después de múltiples rondas de exposición al objetivo el día 7, las células T con CAR de BCMA sin modificar fueron altamente sensibles a AICD, mientras que las células T con CAR de BCMA y CACCR y las células T con CAR de BCMA tratadas con IL-15 estaban protegidas de AICD. Sin pretender limitarse a un mecanismo específico, los datos sugieren que la señalización de citocinas, a través de los CACCR o la IL-15 complementada, puede ayudar a las células T con CAR a resistir el AICD y mejorar la supervivencia, particularmente después de la exposición crónica al objetivo. Los datos se presentan como la media $\pm$ sd de uno de cada dos donantes que arrojaron resultados similares.

La Figura 16 muestra los perfiles de expresión de citocinas de las células T con CAR basados en la tinción de citocinas intracelulares el día 7 del ensayo. La Figura 16A muestra el porcentaje de células T con CAR+ que expresaron las citocinas indicadas. En comparación con el CAR de BCMA sin modificar, las células T con CAR de BCMA y CACCR y las células T con CAR tratadas con IL-15 expresaron niveles más altos de citocinas efectoras. La Figura 16B muestra polifuncionalidad de las células T con CAR, determinada por su capacidad para coexpresar 2 o 3 citocinas efectoras. Comparado con las células T con CAR de BCMA sin modificar, las células T con CAR con el constructo EF1a-TpoR(478-582;H499L,S505N,W515K).IL2Rb(339-379,393-433,528-551)-BCMA CAR mutWPRE demostraron el mayor grado de polifuncionalidad. Los datos muestran la media $\pm$ sd de uno de cada dos donantes que arrojaron resultados similares.

La Figura 17 muestra el fenotipo de memoria de las células T con CAR el día 15 del ensayo. En comparación con las células T con CAR de BCMA sin modificar, las células T con CAR de BCMA y CACCR mostraron un ligero enriquecimiento de las poblaciones de memoria de células madre (T_{SCM}) y memoria central (T_{CM}), que se sabe que median la persistencia de las células T con CAR a largo plazo.

Para monitorear la farmacocinética *in vivo* de las células T con CAR de BCMA y CACCR, se rastreó la expansión y la persistencia de las células T con CAR en un modelo ortotópico de mieloma múltiple mediante el uso de la línea celular Molp8-Luc-GFP. La línea celular Molp8-Luc-GFP expresa niveles más bajos de BCMA que MM.1S-Luc-GFP y representa un modelo de mieloma múltiple que es altamente resistente al tratamiento. Brevemente, los ratones hembra NSG de 8-10 semanas de edad se irradiaron con 1 Gy un día antes de la inoculación intravenosa de 2×10^6 Molp8-Luc-GFP. Los ratones se asignaron al azar en función de la carga tumoral 8 días después de la implantación del tumor y se infundieron por vía intravenosa 1×10^6 o 5×10^6 células T con CAR de BCMA TRAC/CD52 dKO por ratón (n=10 ratones por grupo). Posteriormente, la carga tumoral se controló dos veces por semana mediante imágenes bioluminiscentes, y se extrajo la sangre de los ratones que recibieron 5×10^6 células T con CAR en los puntos de tiempo indicados para la enumeración de las células T con CAR de BCMA en la periferia. Específicamente, 50 μ l de

sangre completa de cada ratón se sometieron a lisis de glóbulos rojos mediante el uso del amortiguador de lisis ACK (Gibco), se bloquearon con Fc y se tiñeron con el siguiente cóctel de anticuerpos diluido en PBS+BSA al 1 %: anti-CD45 de ratón conjugado con FITC (Biolegend), anti-CD45 humano conjugado con BV421 (Biolegend) y anticuerpo anti-idiotipo conjugado con PE para la detección del scFv de P5A2. Finalmente, las muestras se lavaron en PBS y los sedimentos celulares se resuspendieron en 250 μ l de PBS+BSA al 1 % que contenían perlas de recuento 123count eBeads (Thermo Fisher) (10 μ l de perlas de recuento en 240 μ l de PBS+BSA al 1 %) antes del análisis por citometría de flujo.

La Figura 18 muestra la expansión y la persistencia de las células T con CAR de BCMA en ratones con Molp8-Luc-GFP que recibieron 5×10^6 células T con CAR. La Figura 18A muestra que mientras que las células T con CAR de BCMA sin modificar experimentaron una expansión inicial, su número disminuyó rápidamente dentro de las 2 semanas de la infusión de células T con CAR. Por el contrario, las células T con CAR de BCMA y CACCR se expandieron de manera comparable o mejor que sus contrapartes sin modificar y mostraron una persistencia prolongada *in vivo*. La Figura 18B muestra los niveles de expresión de CAR (gMFI) en células T con CAR de BCMA de sangre periférica. Aunque no se detectaron diferencias en la expresión de CAR en el producto de las células T con CAR *in vitro* (Figura 11D), el constructo EF1a-TpoR(478-582;H499L,S505N,W515K). IL2Rb(339-379,393-433,528-551)-BCMA CAR_noWPRE mostró una menor expresión de CAR en relación con sus contrapartes que tienen WPRE *in vivo*. Los datos muestran la media $\pm$ sem.

La Figura 19A y Figura 19B muestran la supervivencia general de los ratones que recibieron 1×10^6 o 5×10^6 células T con CAR. La Figura 19B muestra los resultados extendidos. En ambas dosis, las células T con CAR de BCMA y CACCR prolongaron la supervivencia general. En particular, la supervivencia media de los ratones tratados con 1×10^6 CAR de BCMA y CACCR fue de 61 días, lo que fue comparable a la supervivencia media de 57 días en los ratones tratados con 5×10^6 células T con CAR de BCMA sin modificar.

La Figura 20 muestra la carga tumoral de los ratones individuales que recibieron 5×10^6 células T con CAR. Los ratones tratados con células T con CAR de BCMA sin modificar mostraron uniformemente la progresión de la enfermedad más allá del día 36. Por el contrario, las infusiones de las células T con CAR de BCMA y CACCR pudieron retrasar sustancialmente la progresión de la enfermedad en un subconjunto de ratones. Por tanto, la mayor persistencia de las células T con CAR de BCMA y CACCR se correlaciona con un mejor control tumoral.

Ejemplo 7: La actividad de las células T con CAR de BCMA y CACCR es dependiente del objetivo

Para que las células T con CAR de BCMA y CACCR sean eficaces y seguras, a continuación, se investigó si su actividad está gobernada por el reconocimiento del objetivo

mediado por CAR, y que la señalización del CACCR en ausencia de participación de CAR es insuficiente para inducir respuestas citotóxicas.

Para evaluar la citotoxicidad y las respuestas efectoras de las células T con CAR de BCMA y CACCR, se realizó un ensayo de citotoxicidad durante la noche mediante el uso como objetivo REH-Luc-GFP que sobreexpresa de manera estable BCMA (REH-BCMA) o el REH-Luc-GFP negativo para BCMA original como las células objetivos. Las células T con CAR TRAC/CD52 dKO se generaron como se describió previamente. Las células T con CAR TRAC/CD52 dKO criopreservadas se descongelaron, y el porcentaje de células T con CAR en todas las muestras se normalizó a la muestra con la eficacia de transducción más baja mediante la adición de células T no transducidas (NTD). Se añadieron 10 000 células objetivo en un volumen de 100 μ l a cada pocillo de una placa de cultivo de tejidos blanca de fondo plano de 96 pocillos. A continuación, las células T con CAR se añadieron en un volumen de 100 μ l a cada pocillo de las células objetivo en las relaciones E:O indicadas por triplicado. Como control negativo "solo objetivos", se añadieron a las células objetivo 100 μ l del medio, en lugar de las células T. Después de 24 horas, se determinó el número de células objetivo vivas restantes mediante el uso del sistema de ensayo de luciferasa ONE-Glo (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El porcentaje de células objetivo vivas se calculó mediante la normalización de la señal de luciferasa a la de los pocillos de "solo objetivo", y el porcentaje de citotoxicidad se calculó como $100\% - \%$ de células objetivo vivas.

Para evaluar los perfiles de secreción de citocinas de las células T con CAR de BCMA y CACCR, se sembraron $2,5 \times 10^5$ REH-BCMA o células REH parentales en un volumen de 250 μ l en cada pocillo de una placa de 24 pocillos. Las células T con CAR TRAC/CD52 dKO criopreservadas se descongelaron, y el porcentaje de células T con CAR en todas las muestras se normalizó a la muestra con la eficacia de transducción más baja mediante la adición de células T no transducidas (NTD). A continuación, las células T con CAR se añadieron en un volumen de 250 μ l a cada pocillo de las células objetivo a E:O=1:1 por duplicado. Para evaluar si las células T con CAR de BCMA y CACCR secretaban niveles basales elevados de citocinas, las células T con CAR se cultivaron solas y se añadieron 250 μ l del medio en lugar de las células objetivo. Después de 24 horas, las placas se centrifugaron y se recogieron 200 μ l de sobrenadante de cada pocillo y se almacenaron a -80°C para el análisis Luminex. El día del análisis Luminex, los sobrenadantes de cultivos congelados se descongelaron y se diluyeron 4 o 16 veces antes del análisis mediante el uso del MILLIPLEX MAP Human High Sensitivity T Cell Panel Premixed 21-plex - Immunology Multiplex Assay de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La Figura 21 muestra que las células T con CAR de BCMA y CACCR no producen funciones efectoras citotóxicas en ausencia de BCMA. La Figura 21A muestra la citotoxicidad de las células T con CAR de BCMA y CACCR después de un cocultivo de 24 horas con REH-BCMA o REH negativo para BCMA. Como se esperaba, las células T con

CAR de BCMA y CACCR y CAR de BCMA sin modificar mostraron una destrucción dependiente de la dosis de las células objetivo REH-BCMA. Por el contrario, ni las células T con CAR de BCMA y CACCR y CAR de BCMA sin modificar fueron capaces de destruir las células REH negativas para BCMA. La Figura 21B muestra los perfiles de secreción de

5 citocinas de las células T con CAR de BCMA y CACCR después de una exposición de 24 horas a REH-BCMA, REH negativo para BCMA o en medio solo (solo células T). Como se esperaba, todas las células T con CAR de BCMA secretaron niveles altos y comparables de IFN γ y GM-CSF, y en menor grado IL-2, en respuesta a REH-BCMA. En respuesta a REH negativo para BCMA, o con células T con CAR solas, todas las células T con CAR de BCMA

10 secretaron poca o ninguna citocina, mostrando las células T con CAR de BCMA y CACCR un perfil muy similar a su contraparte sin modificar. Estos datos demuestran que los CACCR no aumentan la citotoxicidad independiente de BCMA o las funciones efectoras de las células T con CAR de BCMA y CACCR.

Para evaluar si la señalización de CACCR por sí sola es suficiente para dirigir la

15 expansión abierta de las células T con CAR de BCMA y CACCR, se realizó un ensayo independiente del factor de crecimiento, donde las células T con CAR de BCMA y CACCR se cultivaron en ausencia de objetivos o citocinas exógenas. Las células T con CAR TRAC/CD52 dKO se generaron como se describió previamente. Las células T con CAR TRAC/CD52 dKO criopreservadas se descongelaron, y el porcentaje de células T con CAR

20 en todas las muestras se normalizó a la muestra con la eficacia de transducción más baja mediante la adición de células T no transducidas (NTD). Se sembraron $2,5 \times 10^5$ células T con CAR/ml en un volumen de 1,5-2 ml en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos por duplicado. Como control positivo, se cultivaron las células T con CAR de BCMA sin modificar en presencia de 10 ng/ml de IL-15 humana recombinante que se reponía semanalmente. En

25 los puntos de tiempo indicados, los pocillos se mezclaron minuciosamente mediante pipeteo y se recogieron 100 μ l de cada pocillo para la enumeración de las células T con CAR mediante análisis por citometría de flujo. Brevemente, las células se lavaron con PBS y se tiñeron con el kit de viabilidad fijable Zombie-NIR (Biolegend). A continuación, las células se lavaron con PBS, se bloquearon con Fc y se tiñeron con un anticuerpo anti-idiotipo conjugado con PE para la detección de scFv de P5A2, anti-CD4 humano conjugado con

30 BV605 (Biolegend) y anti-CD8 humano conjugado con BV510 (Biolegend), diluido en PBS+BSA al 1 %. Después del lavado, las células se resuspendieron en 100 μ l de PBS+BSA al 1 % que contenían perlas de recuento 123count eBeads (Thermo Fisher) (10 μ l de perlas de recuento en 90 μ l de PBS+BSA al 1 %) antes del análisis por citometría de flujo. El día

35 70 del ensayo, cada pocillo se diluyó 2 veces mediante la adición del medio, y los recuentos de las células T con CAR para los puntos de tiempo posteriores se normalizaron en consecuencia multiplicando 2 veces.

La Figura 22A muestra que las células T con CAR de BCMA y CACCR son más persistentes que las células T con CAR de BCMA sin modificar en ausencia de objetivos y

citocinas exógenas. En comparación con las células T con CAR sin modificar que disminuyeron en 3 semanas, las células T con CAR de BCMA y CACCR mostraron una persistencia prolongada en el ensayo independiente del factor de crecimiento. Sin embargo, las células T con CAR de BCMA y CACCR no mostraron una proliferación manifiesta, sino que sufrieron una disminución lenta pero constante. Los datos indican que mientras que la señalización CACCR puede prolongar la supervivencia de las células T con CAR de BCMA y CACCR, la señalización CACCR por sí sola es insuficiente para dirigir la expansión de las células T con CAR de BCMA y CACCR, ni puede mantener una supervivencia indefinida. El ensayo independiente del factor de crecimiento se repitió mediante el uso de IL2 como factor de crecimiento, y la capacidad de las células T con CAR de BCMA y CACCR para expandirse en ausencia de estimulación de citocinas exógenas y objetivos se evaluó *in vitro* por recuento celular y análisis de Ki-67.

Brevemente, las células T con CAR TRAC/CD52 dKO se suspendieron en el medio de ensayo (medio X-VIVO15 (Lonza) que contiene FBS al 10 % (Hyclone)) hasta una concentración final de 1×10^6 células/ml el día 0. Se sembraron 500 μ l (5×10^5 células) de cada muestra por cuádruplicado en una placa de cultivo de tejido de 24 pocillos. Se añadió 1 ml del medio de ensayo a cada pocillo para llevar el volumen final a 1,5 ml. Se añadieron 1,5 ml de PBS a los pocillos exteriores de la placa de 24 pocillos para evitar la evaporación del medio. Dos veces por semana, las células en cada pocillo se mezclaron y se transfirieron 750 μ l de cada pocillo a una nueva placa de 24 pocillos que contenía 750 μ l de medio de ensayo nuevo. Como control positivo, se añadió 1 ml de células MM.1S irradiadas suspendidas a una concentración final de 5×10^5 células/ml en lugar del medio de ensayo, junto con la adición de IL-2 a una concentración final de 50 UI/ml. Dos veces por semana, se mezclaron las células en cada pocillo de control positivo y se transfirieron 750 μ l de cada pocillo a una nueva placa de 24 pocillos que contenía 750 μ l del medio de ensayo fresco, junto con la adición de IL-2 a una concentración final de 50 UI/ml. El volumen restante en cada pocillo se usó para medir las células viables totales (TVC) mediante el uso del analizador NC-200. El ensayo continuó hasta que todos los recuentos de células en cada muestra de prueba dieron cero en el instrumento NC-200. La expansión múltiple de células viables se calculó al dividir las TVC de un punto de tiempo específico por las TVC del día 0. Para cada punto de tiempo después del día 0, el valor de TVC se normalizó por un múltiplo de 2 para tener en cuenta la dilución de la muestra que ocurre dos veces por semana.

Para el análisis Ki-67 que evalúa las células en el ciclo celular activo, en los días 0, 3, 7 y 14, las células se recogieron y se lavaron con 2 ml de amortiguador de tinción que contenía BSA (BD Biosciences). Las células se suspendieron en 100 μ l de amortiguador de tinción que contenía cantidades tituladas previamente de cada uno de los anticuerpos primarios. Para la detección de CAR, se añadieron 5 μ l de proteína BCMA soluble conjugada con FITC. Las células se tiñeron durante 30 min a 4 °C y se lavaron dos veces con 2 ml de PBS. Después del último lavado, el sobrenadante se aspiró y el sedimento celular se aflojó

mediante el uso de un vórtice. Se añadieron gota a gota dos mililitros de etanol frío al 70 % al sedimento celular mientras se agitaba con el vórtex y luego se agitó la mezcla durante 30 segundos más. Las células en etanol al 70 % se incubaron a -20 °C durante 1 hora y luego se lavaron tres veces con amortiguador de tinción celular BioLegend. Las células se suspendieron en 100 µl de amortiguador de tinción celular BioLegend y se añadió una cantidad titulada previamente de anticuerpo anti-Ki-67 humano. Las células se tiñeron en la oscuridad durante 30 min a temperatura ambiente y luego se lavaron dos veces con el amortiguador de tinción celular BioLegend. Finalmente, el sedimento celular se suspendió en amortiguador de tinción celular BioLegend para el análisis de citometría de flujo.

Los datos muestran que las células T con CAR de BCMA y CACCR no muestran un crecimiento independiente del objetivo y de la IL-2 *in vitro*. La Figura 22B muestra que las células T con CAR de BCMA y CACCR y BCMA muestran una expansión mínima o nula durante los primeros 3 días. Después de esto, las células T con CAR de BCMA y CACCR persistieron durante ~ 2 semanas, seguido de una disminución gradual con el tiempo. Para el día 42, las células T con CAR de BCMA y las células T con CAR de BCMA y CACCR no fueron detectables. La Figura 22C muestra que aproximadamente el 30-40 % de las células CAR⁺ en los tres donantes expresaban Ki-67⁺ el día 0. Sin embargo, la expresión de Ki-67 disminuyó sustancialmente el día 3 del cultivo independiente de IL-2 y fue indetectable el día 14. La Figura 22D muestra que tanto las células T con CAR de BCMA como las células T con CAR de BCMA y CACCR eran capaces de una expansión robusta y comparable cuando se cultivaban con células objetivo irradiadas e IL-2.

Los datos confirmaron que el CACCR no mantuvo la supervivencia indefinida del crecimiento de células T con CAR de BCMA y CACCR en ausencia de IL2 u objetivo, ya sea en las células T con CAR basadas en células T o basadas en PBMC derivadas de múltiples donantes.

El ensayo independiente del factor de crecimiento presentado es sólo una forma de evaluar el crecimiento atípico, ya que las células T con CAR nunca han visto el objetivo y, por lo tanto, están inactivas. Además, se buscó evaluar si la expansión y la persistencia de las células T con CAR de BCMA y CACCR permanecían finitas en las células T con CAR de BCMA y CACCR recientemente activadas una vez que se hayan eliminado los objetivos. Con este fin, las células T con CAR de BCMA y CACCR se expusieron primero repetidamente a las células objetivo que expresan BCMA para dirigir su activación y expansión completas, antes de retirar las células objetivo de estos cultivos. Brevemente, las células T con CAR TRAC/CD52 dKO se generaron como se describió previamente. El día 0 del ensayo, las células T con CAR TRAC/CD52 dKO criopreservadas se descongelaron, y el porcentaje de las células T con CAR en todas las muestras se normalizó a la muestra con la eficiencia de transducción más baja mediante la adición de las células T no transducidas (NTD). Se sembraron 3×10⁵ células T CAR⁺ y 1×10⁵ células objetivo MM.1S-Luc-GFP a una E:O de 3:1 en un volumen total de 750 µl por pocillo en una placa de cultivo de tejidos de 48

- pocillos. Como comparador, se añadieron 10 ng/ml de IL-15 humana recombinante (Miltenyi) a los cocultivos de las células T con CAR sin modificar y las células objetivo. Cada 2 o 3 días durante los primeros 7 días, los pocillos se mezclaron minuciosamente mediante un pipeteado suave y se desecharon 200 µl de cada pocillo. Los pocillos después se repusieron
- 5** con 2×10^5 células objetivo frescas MM.1S-Luc-GFP en un volumen de 200 µl. El día 9, se continuó con la adición de las células objetivo cada 2 o 3 días durante el resto del ensayo, o se retiraron por completo. En los pocillos tratados con IL-15, se repusieron 10 ng/ml de IL-15 humana recombinante dos veces por semana. Se prepararon pocillos duplicados para cada condición. En los puntos de tiempo indicados, los pocillos se mezclaron
- 10** minuciosamente mediante pipeteo y se recogieron 50-200 µl de cada pocillo para la enumeración de las células T con CAR mediante el análisis por citometría de flujo. Brevemente, las células se lavaron con PBS y se tiñeron con el kit de viabilidad fijable Zombie-NIR (Biolegend). A continuación, las células se lavaron con PBS, se bloquearon con Fc y se tiñeron con un anticuerpo anti-idiotipo conjugado con PE para la detección de scFv
- 15** de P5A2, anti-CD4 humano conjugado con BV605 (Biolegend) y anti-CD8 humano conjugado con BV510 (Biolegend), diluido en PBS+BSA al 1 %. Después del lavado, las células se resuspendieron en 100 µl de PBS+BSA al 1 % que contenían perlas de recuento 123count eBeads (Thermo Fisher) (10 µl de perlas de recuento en 90 µl de PBS+BSA al 1 %) antes del análisis por citometría de flujo.
- 20** La Figura 23A muestra los perfiles de expansión de las células T con CAR de BCMA recientemente activadas que se estimularon continuamente con las células objetivo o se les retiraron las objetivo. Las células T con CAR de BCMA que se estimularon continuamente con los objetivos demostraron un potencial proliferativo. Sin embargo, cuando los objetivos se retiraron, las células T con CAR de BCMA y CACCR cesaron la proliferación y, en cambio,
- 25** experimentaron una disminución lenta y constante. Esto demuestra que incluso después de una activación robusta, la expansión y la persistencia continuas de las células T con CAR de BCMA y CACCR todavía dependen de la activación CAR inducida por el objetivo.
- A continuación, se evaluó *in vivo* la persistencia a largo plazo de las células T con CAR de BCMA y CACCR en ausencia del objetivo en ratones sin tumores. Para facilitar el
- 30** seguimiento *in vivo* a largo plazo mediante imágenes bioluminiscentes, se generaron células T con CAR marcadas con el indicador de luciferasa Click Beetle Red (CBR). Brevemente, se generaron lentivirus que codifican los CAR de BCMA y BFP-CBR como se describe anteriormente. Las células T con CAR humano TRAC/CD52 dKO se generaron y se criopreservaron como se describió anteriormente, con la excepción de que en el día 2, las
- 35** células T resuspendidas a 0,5 millones de células por ml se cotransdujeron con volúmenes iguales de sobrenadantes lentivirales crudos CAR y BFP-CBR. El porcentaje de células transducidas con CAR y CBR se determinó por citometría de flujo mediante el uso de un anticuerpo anti-idiotipo conjugado con PE específico para el scFv de BCMA y el indicador fluorescente de BFP, respectivamente. El día de la dosificación de células T, las células T

con CAR criopreservadas se descongelaron y se normalizaron a la muestra con la menor eficacia de transducción mediante la adición de células T no transducidas (NTD). Se infundieron 7×10^6 células T con CAR⁺ TRAC/CD52 por vía intravenosa en ratones NSG hembra de 8-10 semanas de edad sin tumores. Comenzando el día de la dosificación de las células T y 1-3 veces por semana a partir de entonces, la farmacocinética de las células T *in vivo* se determinó mediante imágenes bioluminiscentes. En los puntos de tiempo indicados, la sangre de los ratones se extrajo para el recuento de las células T con CAR de BCMA en la periferia. Específicamente, 50 μ l de sangre completa de cada ratón se sometieron a lisis de glóbulos rojos mediante el uso del amortiguador de lisis ACK (Gibco), se bloquearon con Fc y se tiñeron con el siguiente cóctel de anticuerpos diluido en PBS+BSA al 1 %: anti-CD45 de ratón conjugado con FITC (Biolegend), anti-CD45 humano conjugado con AlexaFluor647 (Biolegend), anticuerpo anti-idiotipo conjugado con PE específico para scFv de BCMA y anti-CD3 humano conjugado con BUV395 (usado como sustituto del receptor de células T humanas; BD Biosciences). Finalmente, las muestras se lavaron en PBS y los sedimentos celulares se resuspendieron en 250 μ l de PBS+BSA al 1 % que contenían perlas de recuento 123count eBeads (Thermo Fisher) (10 μ l de perlas de recuento en 240 μ l de PBS+BSA al 1 %) antes del análisis por citometría de flujo.

La Figura 23B muestra que las células T con CAR de BCMA y CACCR no mostraron un crecimiento atípico independiente del objetivo en los ratones sin tumores. En comparación con las células T con CAR de BCMA y NTD, las células T con CAR de BCMA y CACCR tenían una mayor persistencia y supervivencia. Sin embargo, las células T con CAR de BCMA y CACCR no mostraron evidencia de una expansión independiente del objetivo y, en cambio, sufrieron una eventual disminución. La luminiscencia de las células T en cada punto de tiempo se expresa como un cambio múltiplo con respecto a la del día 0. La Figura 23C muestra un aumento de peso comparable entre los ratones que habían recibido las células T con CAR de BCMA y CACCR y las células T con CAR de BCMA. La Figura 23D muestra que no se observó enriquecimiento de células T que expresan el receptor de células T (TCR), lo que sugiere que el CACCR no aumentó el potencial xenorreactivo de las células T con CAR de BCMA. Los datos sugieren que T con CAR de BCMA que expresa un CACCR probablemente no aumentará el potencial de GvHD cuando se administre a los pacientes.

Las células T con CAR que han experimentado recientemente una fuerte activación inducida por el objetivo pueden tener un umbral más alto para volver a la inactividad. Para determinar si la actividad de las células T con CAR de BCMA y CACCR podría detenerse una vez que las células objetivo se eliminaron, se evaluó la expansión y la persistencia a largo plazo de las células T con CAR TRAC/CD52 dKO marcadas con CBR en ratones con tumores subcutáneos mediante imágenes bioluminiscentes.

Las células T con CAR TRAC/CD52 dKO marcadas con CBR se generaron mediante cotransducción de dos vectores como se describe anteriormente, con la excepción de que

las células T CAR+CBR+ doble transducidas se clasificaron mediante FACS basándose en la tinción con un anticuerpo anti-idiotipo conjugado con PE específico para scFv de BCMA, así como también el indicador de BFP. En paralelo, se generaron las células T con CAR TRAC/CD52 dKO sin marcar. Se implantaron subcutáneamente 3×10^6 células Molp8 sin marcar en ratones NSG hembra de 8-10 semanas de edad. Los ratones se asignaron al azar en función de la carga tumoral 17 días después de la implantación del tumor y se infundieron por vía intravenosa un total de 10×10^6 ($9,5 \times 10^6$ sin marcar con $0,5 \times 10^6$ marcados con CBR) células T con CAR TRAC/CD52 dKO por ratón (n=7 u 8 ratones por grupo). Comenzando 1 día después de la dosificación de células T y 1 o 2 veces por semana a partir de entonces, se determinó la farmacocinética de las células T *in vivo* mediante la formación de imágenes bioluminiscentes y se determinó la carga tumoral subcutánea mediante mediciones con calibre. La carga tumoral se calculó con el uso de la fórmula Volumen tumoral = (ancho² x largo/2).

Los datos de la Figura 23E, Figura 23F y Figura 23G demuestran que la expansión *in vivo* de las células T con CAR de BCMA y CACCR fue dependiente del objetivo y que volvieron a la inactividad después de la eliminación del objetivo. La Figura 23E muestra la progresión tumoral inicial en los ratones tratados con las células T con CAR, que se siguió por la regresión del tumor a partir del día 11. Las células T con CAR de BCMA y CACCR eliminaron eficazmente los tumores en 8/8 ratones. Por el contrario, las células T con CAR de BCMA mediaron la eliminación del tumor en 5/7 ratones. La Figura 23F muestra la farmacocinética de las células T con CAR a largo plazo en los ratones con tumores. En respuesta al objetivo del tumor, tanto las células T con CAR de BCMA y CACCR como BCMA experimentaron una fuerte expansión, con una expansión máxima el día 11. Esto fue seguido por una tasa comparable de disminución tanto en las células T con CAR de BCMA y CACCR como BCMA. La Figura 23G muestra un aumento de peso comparable entre los ratones que habían recibido las células T con CAR de BCMA y CACCR y las células T con CAR de BCMA.

Ejemplo 8. Inhibición de las células T con CAR de BCMA y CACCR

Para minimizar cualquier posible problema de seguridad en el desarrollo clínico, el constructo CAR de BCMA se diseñó para incorporar dos mimotopos de rituximab, que sensibilizarían a las células T con CAR de BCMA a la reducción mediada por rituximab. A continuación, se probó los efectos del rituximab en las células T con CAR de BCMA con o sin CACCR. Los resultados demuestran que la exposición de ambos tipos de células T con CAR de BCMA al rituximab disminuyó significativamente las células T con CAR viables de una manera sensible a la dosis, como se muestra en un ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento (Figura 24A) o en un ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo mediado por células NK (Figura 24B).

A continuación, se probó el efecto del rituximab en la disminución de las células T con CAR de BCMA, con o sin CACCR, *in vivo*. Brevemente, los ratones NSG hembra de 8-

10 semanas de edad se irradiaron con 1 Gy un día antes de la inoculación intravenosa de 5×10^6 MM.1S-Luc-GFP. Los ratones se asignaron al azar en función de la carga tumoral 14 días después de la implantación del tumor y se infundieron por vía intravenosa 3×10^6 células T con CAR TRAC/CD52 DKO por ratón ($n=10$ ratones por grupo). Se dosificó por vía intraperitoneal el rituximab (10 mg/kg) o el control del vehículo de PBS comenzando el día de la dosificación de las células T con CAR y luego diariamente durante 4 días adicionales ($n=9$ o 10 por grupo). La carga tumoral se controló dos veces por semana mediante imágenes bioluminiscentes. La sangre de los ratones se extrajo para el recuento de las células T con CAR de BCMA en la periferia 7 días después de la dosificación de las células T con CAR. Específicamente, 50 μ l de sangre completa de cada ratón se sometieron a lisis de glóbulos rojos mediante el uso del amortiguador de lisis ACK (Gibco), se bloquearon con Fc y se tiñeron con el siguiente cóctel de anticuerpos diluido en PBS+BSA al 1 %: anti-CD45 de ratón conjugado con FITC (Biolegend), anti-CD45 humano conjugado con BV421 (Biolegend) y anticuerpo anti-idiotipo conjugado con PE específico para el scFv de P5A2. Finalmente, las muestras se lavaron en PBS y los sedimentos celulares se resuspendieron en 250 μ l de PBS+BSA al 1 % que contenían perlas de recuento 123count eBeads (Thermo Fisher) (10 μ l de perlas de recuento en 240 μ l de PBS+BSA al 1 %) antes del análisis por citometría de flujo.

La Figura 24C y Figura 24D muestran los efectos del tratamiento con rituximab sobre el número de células T con CAR y la cinética de crecimiento tumoral. La Figura 24C muestra los recuentos de las células T con CAR en sangre periférica 7 días después de la dosificación de las células T con CAR. En los ratones con tumores tratados con PBS, las células T con CAR de BCMA y CACCR mostraron una mayor expansión en comparación con las células T con CAR de BCMA. Sin embargo, el tratamiento con rituximab resultó en la eliminación eficaz y completa de ambas células T con CAR, lo que demuestra que las células T con CAR de BCMA y CACCR siguen siendo susceptibles a la reducción mediada por rituximab *in vivo*. La Figura 24D muestra la carga tumoral después de la reducción de células T con CAR mediada por rituximab. Mientras que las células T con CAR controlaron eficazmente el crecimiento tumoral en los ratones tratados con PBS, la eliminación de las células T con CAR por rituximab comprometió la eficacia antitumoral, como lo demuestra la eliminación tumoral subóptima y la posterior progresión tumoral.

Los datos de la Figura 25A y Figura 25B demuestran que las actividades tanto de las células T con CAR de BCMA como de las células T con CAR de BCMA y CACCR también pueden inhibirse por el inhibidor de tirosina quinasa dasatinib. Se ha informado que el dasatinib inhibe la señalización de TCR, la proliferación de las células T y la función efectora. Se probó en un ensayo de destrucción celular *in vitro* el efecto del dasatinib 150 nM sobre las actividades de las células T con CAR de BCMA con o sin el CACCR. Los resultados de la Figura 25A y Figura 25B muestran que el dasatinib abolió la citotoxicidad (Figura 25A) e inhibió la secreción de citocinas por ambos tipos de células T con CAR de BCMA (Figura

25B), aunque se observó que los efectos eran reversibles cuando el dasatinib se eliminó por lavado de los cultivos (datos no mostrado).

Ejemplo 9. Farmacocinética *in vivo* a largo plazo de las células T con CAR de BCMA y CACCR

- 5 La farmacocinética *in vivo* a largo plazo de las células T con CAR de BCMA y CACCR se evaluó adicionalmente en un modelo ortotópico de mieloma múltiple. Los ratones NSG hembra de 8-10 semanas de edad se irradiaron con 1 Gy un día antes de la inoculación intravenosa de 5×10^6 MM.1S-Luc-GFP. Los ratones se asignaron al azar en función de la carga tumoral 15 días de después de la implantación del tumor y se infundió por vía
- 10 intravenosa una dosis subóptima de 3×10^6 células T con CAR de BCMA y CACCR TRAC/CD52 DKO por ratón (n=10 ratones por grupo). A partir de entonces, se controló la carga tumoral dos veces por semana mediante imágenes bioluminiscentes. En los puntos de tiempo indicados a partir del día 30, la sangre de los ratones se extrajo para el recuento de las células T con CAR de BCMA y CACCR en la periferia. Específicamente, 50 ul de
- 15 sangre completa de cada ratón se sometieron a lisis de glóbulos rojos mediante el uso del amortiguador de lisis ACK (Gibco), se bloquearon con Fc y se tiñeron con el siguiente cóctel de anticuerpos diluido en PBS+BSA al 1 %: anti-CD45 de ratón conjugado con FITC (Biolegend), anti-CD45 humano conjugado con BV421 (Biolegend) y anticuerpo anti-idiotipo conjugado con PE específico para el scFv de BCMA. Finalmente, las muestras se lavaron
- 20 en PBS y los sedimentos celulares se resuspendieron en 250 ul de PBS+BSA al 1 % que contenían perlas de recuento 123count eBeads (Thermo Fisher) (10 ul de perlas de recuento en 240 ul de PBS+BSA al 1 %) antes del análisis por citometría de flujo.

- La Figura 26A, Figura 26B y Figura 26C demuestran de nuevo que la expansión *in vivo* de las células T con CAR de BCMA y CACCR fue dependiente del objetivo. La Figura
- 25 26A muestra varias respuestas anti-tumorales en ratones individuales después del tratamiento con una dosis subóptima de 3×10^6 células T con CAR de BCMA y CACCR TRAC/CD52 DKO, a cuya dosis la enfermedad recayó significativamente en algunos ratones, y retrocedió completamente en otros. La Figura 26B muestra que la recaída de la enfermedad fue seguida por un fuerte aumento en la expansión de células T con CAR de
- 30 BCMA y CACCR. La Figura 26C muestra que en ratones en los que se eliminaron los tumores, no se observó expansión de las células T con CAR de BCMA y CACCR, y el número de células T con CAR de BCMA y CACCR disminuyó hasta el límite de detección el día 80. Tomados en conjunto, estos demuestran que la expansión activa de las células T con CAR de BCMA y CACCR fue dependiente del objetivo, y que la señalización constitutiva
- 35 a través del CACCR solo era insuficiente para dirigir la expansión de las células T con CAR independientes del objetivo o la supervivencia indefinida.

Ejemplo 10. El efecto de CACCR en las células T con CAR de BCMA en un modelo ortotópico de mieloma múltiple

A continuación, se evaluó el efecto de las células T con CAR de BCMA y CACCR sobre la actividad y la farmacocinética *in vivo* en un modelo ortotópico de mieloma múltiple, en el que la enfermedad se establece inicialmente en la médula ósea y la recaída se produce posteriormente en los sitios extramedulares. Los ratones NSG hembra de 8-10 semanas de edad se irradiaron con 1 Gy un día antes de la inoculación intravenosa de 5×10^6 MM.1S-Luc-GFP. Los ratones se asignaron al azar en función de la carga tumoral 15 días después de la implantación del tumor y se infundieron por vía intravenosa las cantidades indicadas de células T con CAR de BCMA y CACCR TRAC/CD52 dKO por ratón (n=10 ratones por grupo). A partir de entonces, se controló la carga tumoral dos veces por semana mediante imágenes bioluminiscentes. En los puntos de tiempo indicados, la sangre de los ratones se extrajo para el recuento de las células T con CAR de BCMA y CACCR en la periferia.

La Figura 27A, Figura 27B, Figura 27C y Figura 27D muestran que el CACCR mejoró la eficacia antitumoral y la expansión de las células T con CAR de BCMA en el modelo ortotópico de mieloma múltiple. La Figura 27A muestra la eficacia antitumoral en respuesta al número indicado de células T con CAR. En comparación con los grupos tratados con células T con CAR de BCMA que recayeron el día 38, los ratones que recibieron las células T con CAR de BCMA y CACCR mostraron una mayor durabilidad de la respuesta. La Figura 27B, Figura 27C y Figura 27D muestran la farmacocinética de las células T con CAR en la sangre periférica de los ratones que recibieron 1×10^6 (Figura 27B), 3×10^6 (Figura 27C) o 5×10^6 (Figura 27D) células T con CAR. De acuerdo con la eficacia antitumoral mejorada, los resultados muestran que el CACCR aumentó la expansión de las células T con CAR de BCMA *in vivo*.

25

30

35