

RECEPTORES ANTIGÉNICOS QUIMÉRICOS CON ESPECIFICIDAD PARA BCMA Y USOS DE ESTOS

REFERENCIA A UN LISTADO DE SECUENCIAS

Esta solicitud incorpora como referencia el Listado de Secuencias enviado en Formato Legible por Computadora como archivo 10455WO01-Sequence.txt, creado el 17 de julio de 2019 y que contiene 66 907 bytes.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a receptores antigénicos quiméricos (CAR) y células modificadas genéticamente que comprenden tales CAR, que son específicos para el antígeno de maduración de células B (BCMA), y métodos de uso de estos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El antígeno de maduración de células B (BCMA), también conocido como TNFRSF17 o CD269, es una proteína transmembrana de tipo III que carece de un péptido señal y que contiene un dominio extracelular rico en cisteína. El BCMA, junto con proteínas estrechamente relacionadas, promueve la supervivencia de las células B en distintas etapas de desarrollo. El BCMA se expresa exclusivamente en células de linaje de células B, particularmente en la región interfolicular del centro germinal, así como también en plasmablastos y células plasmáticas diferenciadas. El BCMA se induce selectivamente durante la diferenciación de las células plasmáticas y es necesario para la supervivencia óptima de las células plasmáticas de larga duración en la médula ósea. En el mieloma múltiple, el BCMA se expresa ampliamente en células plasmáticas malignas a niveles elevados, y la expresión de BCMA aumenta con la progresión de células normales a mieloma múltiple activo. El BCMA se expresa, además, en otras neoplasias malignas de células B, que incluye la macroglobulinemia de Waldenström, el linfoma de Burkitt y el linfoma difuso de células B grandes. Tai y *otros*, *Immunotherapy*, 7(11):1187-1199, 2015.

La inmunoterapia adoptiva, que implica la transferencia de células T autólogas específicas de antígeno generadas *ex vivo*, es una estrategia prometedora para tratar infecciones virales y cáncer. Las células T usadas para la inmunoterapia adoptiva pueden generarse mediante la expansión de células T específicas de antígeno o por redireccionamiento de las células T mediante ingeniería genética.

Se han generado con éxito especificidades novedosas en las células T mediante la transferencia genética de receptores de células T transgénicas o de receptores antigénicos quiméricos (CAR) (Jena, Dotti y otros, 2010). Los CAR son receptores sintéticos que consisten en una porción de direccionamiento que está asociada con uno o más dominios de señalización en una molécula de fusión única. En general, la porción de unión de un CAR consiste en un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo monocatenario (scFv), que comprende los fragmentos variables de cadena ligera y pesada de un anticuerpo monoclonal unidos por un enlazador flexible. Los dominios de señalización para los CAR de primera generación se derivaron de la región citoplasmática de las cadenas gamma del receptor CD3zeta o Fc. Se ha demostrado que los CAR de primera generación redirigen con éxito la citotoxicidad de las células T. Sin embargo, no lograron proporcionar expansión prolongada y actividad antitumoral *in vivo*. Se han agregado dominios de señalización de moléculas coestimuladoras, así como también dominios transmembrana y bisagra para formar CAR de segunda y tercera generación, lo que condujo a algunos ensayos terapéuticos exitosos en humanos. Por ejemplo, las células T con redireccionamiento a CAR específicas para el antígeno de diferenciación de células B CD19 han demostrado una eficacia espectacular en el tratamiento de neoplasias malignas de células B, mientras que las células T con redireccionamiento a TCR han mostrado beneficios en pacientes que padecen de tumores sólidos. Stauss y otros, describen estrategias para modificar los CAR y TCR terapéuticos, para usar en el tratamiento del cáncer, por ejemplo, para mejorar la función efectora específica de antígeno y limitar la toxicidad de las células T modificadas genéticamente (*Current Opinion in Pharmacology* 2015, 24:113-118).

Las células modificadas genéticamente que expresan receptores antigénicos quiméricos que se dirigen al BCMA serían útiles en entornos terapéuticos en los que es conveniente la destrucción de células que expresan el BCMA mediada por células T con direccionamiento específico.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En un aspecto, la presente invención proporciona un receptor antigénico quimérico específico del antígeno de maduración de células B (BCMA) que comprende, desde el extremo N terminal al extremo C terminal: (a) un dominio extracelular de unión a ligando que comprende un dominio de unión al antígeno anti-BCMA; (b) una bisagra; (c) un dominio transmembrana; y (d) un dominio citoplasmático que comprende un dominio coestimulador y un dominio de señalización.

En algunos casos, el dominio extracelular de unión al ligando comprende un dominio de fragmento variable de cadena única anti-BCMA (scFv) que comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) y una región variable de cadena pesada (HCVR). En algunas modalidades, el dominio scFv anti-BCMA comprende un enlazador entre la LCVR y la HCVR. En algunos casos, el receptor antigénico quimérico comprende, además, un enlazador entre el dominio extracelular de unión al ligando (*por ejemplo*, el dominio scFv) y la bisagra. En algunos casos, el enlazador comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 93-96. En algunas modalidades, el enlazador es un enlazador (G4S)_n, en donde n es 1-10.

En algunos casos, la bisagra, el dominio transmembrana, o ambos, son de un polipéptido CD8α. En algunos casos, el dominio coestimulador comprende un dominio coestimulador 4-1BB. En algunos casos, el dominio de señalización comprende un dominio de señalización CD3zeta. En algunas modalidades, la bisagra comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 97. En algunas modalidades, el dominio transmembrana comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 98. En algunas modalidades, el dominio coestimulador 4-1BB comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 99. En algunas modalidades, el dominio de señalización CD3zeta comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 100. En algunos casos, la LCVR comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de una LCVR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58 y 74. En algunos casos, la LCVR comprende los dominios LCDR1-LCDR2-LCDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos, respectivamente, de las SEQ ID NO: 12-14-16, 28-30-32, 44-46-48, 60-62-64, o 76-78-80. En algunos casos, la HCVR comprende las CDR de una HCVR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50 y 66. En algunos casos, la HCVR comprende los dominios HCDR1-HCDR2-HCDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos, respectivamente, de las SEQ ID NO: 4-6-8, 20-22-24, 36-38-40, 52-54-56, o 68-70-72.

En algunas modalidades, la LCVR comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58 y 74, o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 95 %-99 % con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58 y 74; y la HCVR comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50 y 66, o una

secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 95 %-99 % con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50 y 66. En algunos casos, la LCVR comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58 y 74, y la HCVR comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50 y 66.

En algunas modalidades, el dominio scFv comprende un par de secuencias de aminoácidos LCVR/HCVR que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 10/2, 26/18, 42/34, 58/50, o 74/66. En algunos casos, las LCVR y HCVR están unidas por un enlazador, opcionalmente un enlazador (G4S)_n en el que n=1-3.

En algunos casos, el receptor antigénico quimérico comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, o SEQ ID NO: 90. En algunas modalidades, el receptor antigénico quimérico comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 82. En algunas modalidades, el receptor antigénico quimérico comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 84. En algunas modalidades, el receptor antigénico quimérico comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 86. En algunas modalidades, el receptor antigénico quimérico comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 88. En algunas modalidades, el receptor antigénico quimérico comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 90.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un receptor antigénico quimérico discutido anteriormente o en la presente descripción. En algunos casos, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 81, 83, 85, 87 y 89.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un vector que comprende una molécula de ácido nucleico discutida anteriormente o en la presente descripción. En algunos casos, el vector es un vector de ADN, un vector de ARN, un plásmido, un vector de lentivirus, un vector de adenovirus o un vector retroviral. En algunas modalidades, el vector es un vector de lentivirus.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una célula que comprende una molécula de ácido nucleico o un vector discutido anteriormente o en la presente descripción. En algunos casos, la célula es una célula T humana.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una célula modificada genéticamente que comprende un receptor antigénico quimérico como se discutió

anteriormente o en la presente descripción. En algunos casos, la célula modificada genéticamente es una célula inmunitaria. En algunos casos, la célula inmunitaria es una célula efectora inmunitaria. En algunos casos, la célula efectora inmunitaria es un linfocito T. En algunas modalidades, el linfocito T es un linfocito T inflamatorio, un linfocito T citotóxico, un linfocito T regulador o un linfocito T auxiliar. En algunas modalidades, la célula modificada genéticamente es un linfocito T citotóxico CD8+.

En algunos casos, las células modificadas genéticamente de la presente invención se usan en el tratamiento de un cáncer que expresa el BCMA. En algunos casos, el cáncer que expresa el BCMA es mieloma múltiple.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una célula T humana modificada genéticamente que comprende un receptor antigénico quimérico que comprende, desde el extremo N terminal al extremo C terminal: (a) un dominio extracelular de unión a ligando que comprende un dominio de fragmento variable de cadena única anti-BCMA (scFv) que comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) y una región variable de cadena pesada (HCVR); (b) una bisagra; (c) un dominio transmembrana; y (d) un dominio citoplasmático que comprende un dominio coestimulador 4-1BB y un dominio de señalización CD3zeta.

En algunos casos, el dominio scFv comprende un par de secuencias de aminoácidos LCVR/HCVR que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 10/2, 26/18, 42/34, 58/50, o 74/66. En algunos casos, la bisagra comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 97. En algunos casos, el dominio transmembrana comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 98. En algunos casos, el dominio coestimulador 4-1BB comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 99. En algunos casos, el dominio de señalización CD3zeta comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 100.

En algunas modalidades, la célula T humana modificada genéticamente comprende un receptor antigénico quimérico que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 82. En algunas modalidades, la célula T humana modificada genéticamente comprende un receptor antigénico quimérico que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 84. En algunas modalidades, la célula T humana modificada genéticamente comprende un receptor antigénico quimérico que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 86. En algunas modalidades, la célula T humana modificada genéticamente comprende un receptor antigénico quimérico que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 88. En algunas modalidades, la célula T humana modificada genéticamente

comprende un receptor antigénico quimérico que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 90.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una célula T humana modificada genéticamente y un portador farmacéuticamente aceptable, en donde la célula T humana modificada genéticamente comprende un receptor antigénico quimérico como se discutió anteriormente o en la presente descripción. En algunos casos, la composición farmacéutica es para usar en el tratamiento de un cáncer que expresa el BCMA. En algunas modalidades, el cáncer que expresa el BCMA es mieloma múltiple.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una célula modificada genéticamente como se discutió anteriormente o en la presente descripción. En algunos casos, la composición farmacéutica es para usar en el tratamiento de un cáncer que expresa el BCMA. En algunas modalidades, el cáncer que expresa el BCMA es mieloma múltiple.

En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de un receptor antigénico quimérico, una molécula de ácido nucleico, un vector, una célula o una célula modificada genéticamente como se discutió anteriormente o en la presente descripción en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer que expresa el BCMA. En algunos casos, el cáncer que expresa el BCMA es mieloma múltiple. En diversas modalidades, los receptores antigénicos quiméricos, moléculas de ácido nucleico, vectores, células o células modificadas genéticamente descritas anteriormente o en la presente descripción se contemplan para usar en cualquiera de los métodos discutidos anteriormente o en la presente descripción. Por ejemplo, en algunas modalidades, los CAR o las células modificadas genéticamente discutidos en la presente descripción son para usar en medicina o para usar en el tratamiento del cáncer como se discutió anteriormente o en la presente descripción.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para mejorar la actividad de los linfocitos T en un sujeto que comprende introducir en el sujeto un linfocito T que comprende un receptor antigénico quimérico como se discutió anteriormente o en la presente descripción.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar a un sujeto que padece de cáncer que comprende introducir en el sujeto una cantidad con eficacia terapéutica de un linfocito T que comprende un receptor antigénico quimérico como se discutió anteriormente o en la presente descripción.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para estimular una respuesta inmunitaria mediada por células T hacia una población o tejido de células diana en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una célula modificada genéticamente para expresar un receptor antigénico quimérico como se discutió anteriormente o en la presente descripción.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para proporcionar inmunidad antitumoral en un sujeto, el método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una célula modificada genéticamente para expresar un receptor antigénico quimérico como se discutió anteriormente o en la presente descripción.

En algunas modalidades de los métodos discutidos anteriormente, el sujeto es un humano. En algunos casos, el sujeto padece mieloma múltiple, leucemia linfoblástica aguda de linaje B, leucemia linfocítica crónica de células B, linfoma no Hodgkin de células B, leucemia y linfoma, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de Hodgkin o leucemia linfoblástica aguda infantil. En algunas modalidades, el sujeto padece mieloma múltiple.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para modificar genéticamente una población de células para expresar un receptor antigénico quimérico, en el que el método comprende: (a) proporcionar una población de células inmunitarias; (b) introducir en las células inmunitarias una molécula de ácido nucleico que codifica un receptor antigénico quimérico como se discutió anteriormente o en la presente descripción; (c) cultivar las células inmunitarias en condiciones para expresar las moléculas de ácido nucleico; y (d) aislar las células inmunitarias que expresan el receptor antigénico quimérico en la superficie de las células. En algunos casos, el método comprende, además, obtener la población de células inmunitarias de un sujeto antes de introducir la molécula de ácido nucleico.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar un cáncer que expresa BCMA en un sujeto, en el que el método comprende: (a) modificar genéticamente una población de células de acuerdo con el método discutido anteriormente; y (b) reintroducir la población de células inmunitarias que expresan los receptores antigénicos quiméricos en el sujeto. En algunas modalidades, el cáncer que expresa el BCMA es mieloma múltiple.

Otras modalidades serán evidentes a partir de una revisión de la siguiente descripción detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 ilustra una construcción de nucleótidos ilustrativa para expresar una construcción del receptor antigénico quimérico (CAR). La construcción de nucleótidos ilustrativa comprende un scFv anti-BCMA VL-enlazador-VH, una bisagra CD8 humana y un dominio transmembrana, un dominio coestimulador 4-1BB, un dominio de señalización CD3zeta y una secuencia IRES: eGFP para la trazabilidad de las células transducidas con CAR.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Antes de describir la presente invención, debe entenderse que esta invención no se limita a los métodos particulares ni a las condiciones experimentales descritas, ya que tales métodos y condiciones pueden variar. Debe entenderse, además, que la terminología usada en la presente descripción tiene el propósito de describir modalidades particulares solamente, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas. Cualquier modalidad o característica de las modalidades pueden combinarse entre sí, y tales combinaciones están expresamente incluidas dentro del alcance de la presente invención. Cualquier valor específico discutido anteriormente o en la presente descripción puede combinarse con otro valor relacionado discutido anteriormente o en la presente descripción para citar un intervalo con los valores que representan los extremos superior e inferior del intervalo, y tales intervalos están incluidos dentro del alcance de la presente descripción.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Como se usa en la presente descripción, la expresión "aproximadamente", cuando se usa en referencia a un valor numérico descrito en particular, significa que el valor puede variar del valor descrito en no más de 1 %. Por ejemplo, como se usa en la presente descripción, la expresión "aproximadamente 100" incluye 99 y 101 y todos los valores intermedios (por ejemplo, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, etcétera).

Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente descripción pueden usarse en la práctica o en pruebas de la presente invención, a continuación, se describen los métodos y materiales preferidos. Todas las patentes, solicitudes y publicaciones que no son patentes mencionadas en esta descripción se incorporan como referencia en su totalidad en la presente descripción.

Definiciones

La expresión "BCMA", como se usa en la presente descripción, se refiere al antígeno de maduración de células B. El BCMA (también conocido como TNFRSF17 y CD269) es una proteína de la superficie celular que se expresa en células plasmáticas malignas y desempeña un papel central en la regulación de la maduración y diferenciación de las células B en células plasmáticas productoras de inmunoglobulina. Como se usa en la presente descripción, "BCMA" se refiere a la proteína BCMA humana a menos que se especifique que es de una especie no humana (*por ejemplo*, "BCMA de ratón", "BCMA de mono", etcétera). La proteína BCMA humana tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 101.

Como se usa en la presente descripción, "un anticuerpo que se une a BCMA" o un "anticuerpo anti-BCMA" incluye anticuerpos y fragmentos de fijación al antígeno de estos que reconocen específicamente a BCMA.

Los términos "dominio de unión a ligando" y "dominio de unión a antígeno" se usan indistintamente en la presente descripción, y se refieren a la parte de un receptor antigénico quimérico o un anticuerpo correspondiente que se une específicamente a un antígeno predeterminado (por ejemplo, BCMA). Las referencias a un "anticuerpo correspondiente" se refieren al anticuerpo del que se derivan las CDR o regiones variables (HCVR y LCVR) usadas en un receptor antigénico quimérico. Por ejemplo, las construcciones de receptor antigénico quimérico discutidas en el Ejemplo 2 incluyen scFv con regiones variables derivadas de anticuerpos específicos anti-BCMA. Estos anticuerpos anti-BCMA son los "anticuerpos correspondientes" a los respectivos receptores antigénicos quiméricos.

El término "anticuerpo", como se usa en la presente descripción, significa cualquier molécula o complejo molecular de unión al antígeno que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) que se une o interactúa con un antígeno en particular (por ejemplo, BCMA). El término "anticuerpo" incluye moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) que están interconectadas mediante enlaces disulfuro, así como también multímeros de estas (por ejemplo, IgM). El término "anticuerpo" incluye, además, moléculas de inmunoglobulina que consisten en cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) que interconectadas mediante enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de la cadena pesada (abreviada en la presente descripción como HCVR o V_H) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la

cadena pesada comprende tres dominios, C_H1 , C_H2 y C_H3 . Cada cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera (abreviada en la presente descripción como LCVR o V_L) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera comprende un dominio (C_L1). Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse, además, en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones más conservadas, denominadas regiones de marco (FR). Cada V_H y V_L está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino terminal hasta el extremo carboxi terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. En diferentes modalidades de la invención, las FR del anticuerpo anti- BCMA (o la porción de unión al antígeno de este) pueden ser idénticas a las secuencias de línea germinal humanas, o pueden modificarse de manera natural o artificial. Una secuencia de aminoácidos consenso puede definirse en función de un análisis paralelo de dos o más CDR.

El término "anticuerpo", como se usa en la presente descripción, incluye además, fragmentos de unión al antígeno de moléculas de anticuerpo completas. Las expresiones "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo, "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo, y similares, como se usan en la presente descripción, incluyen cualquier polipéptido o glucoproteína de origen natural, que puede obtenerse enzimáticamente, sintético o modificado genéticamente que se une específicamente a un antígeno para formar un complejo. Los fragmentos de unión al antígeno de un anticuerpo pueden derivarse de, por ejemplo, moléculas de anticuerpo completas que usan cualquier técnica estándar adecuada, tal como la digestión proteolítica, o técnicas de ingeniería genética recombinantes que involucran la manipulación y la expresión de ADN que codifica dominios variables y, opcionalmente, constantes de anticuerpos. Tal ADN es conocido y/o está disponible con facilidad de, por ejemplo, fuentes comerciales, bibliotecas de ADN (que incluyen, por ejemplo, bibliotecas de anticuerpos de fago), o puede sintetizarse. El ADN puede secuenciarse y manipularse químicamente o mediante el uso de técnicas de biología molecular, por ejemplo, para disponer de uno o más dominios variables y/o constantes en una configuración adecuada, o para introducir codones, crear residuos de cisteína, modificar, agregar o eliminar aminoácidos, etcétera.

Los ejemplos no limitantes de fragmentos de unión al antígeno incluyen: (i) fragmentos Fab; (ii) fragmentos $F(ab')_2$; (iii) fragmentos Fd; (iv) fragmentos Fv; (v) moléculas Fv monocatenarias (scFv); (vi) fragmentos dAb; y (vii) unidades de reconocimiento

mínimas que consisten en los residuos de aminoácidos que imitan la región hipervariable de un anticuerpo (por ejemplo, una región determinante de la complementariedad aislada (CDR), tal como un péptido CDR3), o un péptido FR3-CDR3-FR4 restringido. Otras moléculas modificadas genéticamente, tales como anticuerpos específicos de dominio, anticuerpos de dominio único, anticuerpos de dominio eliminado, anticuerpos quiméricos, anticuerpos injertados con CDR, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos, nanocuerpos (por ejemplo, nanocuerpos monovalentes, nanocuerpos bivalentes, etcétera), proteínas inmunofarmacéuticas modulares pequeñas (SMIP) y dominios IgNAR variables de tiburón, también están incluidas dentro de la expresión "fragmento de unión al antígeno", como se usa en la presente descripción.

Un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo comprenderá típicamente al menos un dominio variable. El dominio variable puede ser de cualquier tamaño o composición de aminoácidos y, en general, comprenderá al menos una CDR que es adyacente a o está en marco con una o más secuencias de marco. En los fragmentos de unión al antígeno que tienen un dominio V_H asociado a un dominio V_L , los dominios V_H y V_L pueden estar situados uno con respecto al otro en cualquier disposición adecuada. Por ejemplo, la región variable puede ser dimérica y contener dímeros V_H - V_H , V_H - V_L o V_L - V_L . Alternativamente, el fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo puede contener un dominio V_H o V_L monomérico.

En determinadas modalidades, un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo puede contener al menos un dominio variable unido covalentemente a al menos un dominio constante. Los ejemplos no limitantes de las configuraciones de dominios variables y constantes que pueden encontrarse dentro de un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo de la presente invención incluyen: (i) V_H - C_H1 ; (ii) V_H - C_H2 ; (iii) V_H - C_H3 ; (iv) V_H - C_H1 - C_H2 ; (v) V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (vi) V_H - C_H2 - C_H3 ; (vii) V_H - C_L ; (viii) V_L - C_H1 ; (ix) V_L - C_H2 ; (x) V_L - C_H3 ; (xi) V_L - C_H1 - C_H2 ; (xii) V_L - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (xiii) V_L - C_H2 - C_H3 ; y (xiv) V_L - C_L . En cualquier configuración de dominios variables y constantes, que incluyen cualquiera de las configuraciones ilustrativas que se enumeran anteriormente, los dominios variables y constantes pueden estar directamente enlazados entre sí o pueden estar enlazados mediante una región bisagra total o parcial o una región enlazadora. Una región bisagra puede consistir en al menos 2 (por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 40, 60 o más) aminoácidos que resultan en un enlace flexible o semiflexible entre los dominios variables y/o constantes adyacentes en una molécula polipeptídica única. Además, un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo de la presente invención

puede comprender un homodímero o heterodímero (u otro multímero) de cualquiera de las configuraciones de dominio constante y variable que se enumeran con anterioridad en asociación no covalente entre sí y/o con uno o más dominios V_H o V_L monoméricos (por ejemplo, mediante puentes disulfuros).

En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-BCMA son anticuerpos humanos. La expresión “anticuerpo humano”, como se usa en la presente descripción, incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas *in vitro* mediante mutagénesis aleatoria o específica de sitio o mediante mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR y en particular la CDR3. Sin embargo, la expresión “anticuerpo humano”, como se usa en la presente descripción, no pretende incluir anticuerpos en donde las secuencias de CDR que derivan de la línea germinal de otras especies de mamíferos, tal como un ratón, se injertaron en secuencias de marco humanas.

Los anticuerpos pueden, en algunas modalidades ser anticuerpos humanos recombinantes. La expresión “anticuerpo humano recombinante”, como se usa en la presente descripción, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como los anticuerpos expresados mediante el uso de un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped (descrito adicionalmente más abajo), los anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos combinatorios recombinantes (descritos adicionalmente más abajo), los anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para los genes de inmunoglobulina humana (ver, por ejemplo, Taylor y otros, (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295) o los anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados mediante cualquier otro medio que implique el corte y empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes que derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En determinadas modalidades, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y, por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque se deriven de secuencias V_H y V_L de línea

germinal humana y se relacionan con ellas, es posible que no existan de manera natural dentro del repertorio de anticuerpos humanos de línea germinal *in vivo*.

Los anticuerpos humanos pueden existir en dos formas que se asocian con la heterogeneidad de la bisagra. En una forma, una molécula de inmunoglobulina comprende una construcción estable de cuatro cadenas de aproximadamente 150-160 kDa en donde los dímeros se mantienen unidos mediante un puente disulfuro intercatenario de la cadena pesada. En una segunda forma, los dímeros no están enlazados a través de puentes disulfuro intercatenarios y se forma una molécula de alrededor de 75-80 kDa compuesta por una cadena ligera y cadena pesada (medio anticuerpo) acoplada en forma covalente. Estas formas fueron extremadamente difíciles de separar, incluso después de la purificación por afinidad.

La frecuencia de aparición de la segunda forma en diversos isotipos de IgG intactos se debe a, pero no se limita a, diferencias estructurales asociadas al isotipo de la región bisagra del anticuerpo. Una única sustitución de aminoácidos en la región bisagra de la bisagra de IgG4 humana puede reducir significativamente la aparición de la segunda forma (Angal y otros, (1993) Molecular Immunology 30:105) a niveles observados típicamente mediante el uso de una bisagra de IgG1 humana. La presente invención abarca anticuerpos que tienen una o más mutaciones en la región bisagra C_H2 o C_H3 que pueden ser convenientes, por ejemplo, en la producción, para mejorar el rendimiento de la forma de anticuerpo conveniente.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos aislados. Como se usa en la presente descripción, un "anticuerpo aislado" significa un anticuerpo que se identificó y se separó, y/o se recuperó de al menos un componente de su entorno natural. Por ejemplo, un anticuerpo que se separó o eliminó de al menos un componente de un organismo, o de un tejido o célula en donde el anticuerpo existe naturalmente o se produce naturalmente, es un "anticuerpo aislado" para los fines de la presente invención. Un anticuerpo aislado incluye, además, un anticuerpo *in situ* dentro de una célula recombinante. Los anticuerpos aislados son anticuerpos que se sometieron a al menos una etapa de purificación o aislamiento. De acuerdo con determinadas modalidades, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otros productos químicos y/o materiales celulares.

Los anticuerpos anti- BCMA descritos en la presente descripción pueden comprender una o más sustituciones inserciones y/o deleciones de aminoácidos en las regiones de marco y/o CDR de los dominios variables de la cadena pesada y ligera en comparación con las secuencias de línea germinal correspondientes de las que se

derivaron los anticuerpos. Tales mutaciones pueden determinarse fácilmente mediante la comparación de las secuencias de aminoácidos descritas en la presente descripción con las secuencias de la línea germinal disponibles en, por ejemplo, bases de datos públicas de secuencias de anticuerpos. La presente invención incluye anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de estos, que se derivan de cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas en la presente descripción, en donde uno o más aminoácidos dentro de una o más regiones de marco y/o regiones CDR están mutados con respecto a los residuos correspondientes de la secuencia de la línea germinal de la que deriva el anticuerpo, o a los correspondientes residuos de otra secuencia de la línea germinal humana, o a una sustitución conservadora de aminoácidos de los residuos de la línea germinal correspondiente (tales cambios de secuencia se denominan en la presente descripción colectivamente como "mutaciones de la línea germinal"). Un experto en la técnica puede producir fácilmente, a partir de las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera descritas en la presente descripción, numerosos anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno que comprenden una o más mutaciones de la línea germinal individuales o combinaciones de estas. En determinadas modalidades, todos los residuos de marco y/o CDR dentro de los dominios V_H y/o V_L están mutados nuevamente con respecto a los residuos que se encuentran en la secuencia de la línea germinal original de la que el anticuerpo se deriva. En otras modalidades, solo determinados residuos están mutados nuevamente con respecto a la secuencia original de la línea germinal, por ejemplo, solo los residuos mutados se encuentran dentro de los primeros 8 aminoácidos de FR1 o dentro de los últimos 8 aminoácidos de FR4, o solo los residuos mutados se encuentran dentro de CDR1, CDR2 o CDR3. En otras modalidades, uno o más de los residuos de marco y/o CDR están mutados con respecto a los residuos correspondientes de una secuencia de línea germinal diferente (es decir, una secuencia de línea germinal que es diferente de la secuencia de línea germinal de la cual el anticuerpo deriva originalmente). Además, los anticuerpos de la presente invención pueden contener cualquier combinación de dos o más mutaciones de línea germinal en las regiones de marco y/o CDR, por ejemplo, en donde determinados residuos individuales están mutados en el residuo correspondiente de una secuencia de línea germinal particular mientras que determinados otros residuos que no son los de la secuencia de la línea germinal original se mantienen o mutan con respecto al residuo correspondiente de una secuencia de línea germinal diferente. Una vez obtenidos, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno que contienen una o más

mutaciones de la línea germinal pueden analizarse fácilmente para determinar una o más propiedades convenientes, tales como especificidad de unión mejorada, afinidad de unión aumentada, propiedades biológicas agonistas o antagonistas mejoradas o potenciadas (según sea el caso), inmunogenicidad reducida, etcétera. Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno que se obtienen de esta manera general están incluidos dentro de la presente invención.

Los anticuerpos anti-BCMA pueden comprender variantes de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR descritas en la presente descripción que tienen una o más sustituciones conservadoras. Por ejemplo, los anticuerpos anti-BCMA pueden tener secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR con, por ejemplo, 10 o menos, 8 o menos, 6 o menos, 4 o menos, etcétera, sustituciones de aminoácidos conservadoras con respecto a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR establecidas en la presente descripción.

El término "epítipo" se refiere a un determinante antigénico que interactúa con un sitio de unión al antígeno específico en la región variable de una molécula de anticuerpo conocida como un paratopo. Un solo antígeno puede tener más de un epítipo. Por lo tanto, distintos anticuerpos pueden unirse a distintas áreas en un antígeno y pueden tener efectos biológicos diferentes. Los epítipos pueden ser conformacionales o lineales. Un epítipo conformacional se produce por aminoácidos espacialmente juxtapuestos de distintos segmentos de la cadena de polipeptídica lineal. Un epítipo lineal es aquel producido por residuos de aminoácidos adyacentes en una cadena polipeptídica. En algunas circunstancias, un epítipo puede incluir porciones de sacáridos, grupos fosforilo o grupos sulfonilo sobre el antígeno.

La expresión "identidad sustancial" o "sustancialmente idénticos", cuando se refiere a un ácido nucleico o fragmento de este, indica que, cuando se alinean óptimamente con las inserciones o deleciones de nucleótidos adecuados con otro ácido nucleico (o su cadena complementaria), hay una identidad de secuencia de nucleótidos en al menos aproximadamente de 95 %, y con mayor preferencia, al menos aproximadamente de 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de las bases de nucleótidos, como se mide mediante cualquier algoritmo bien conocido de identidad de secuencia, tal como FASTA, BLAST o Gap, como se discute más abajo. Una molécula de ácido nucleico que tiene identidad sustancial con una molécula de ácido nucleico de referencia puede, en determinados casos, codificar un polipéptido que tiene la misma secuencia de

aminoácidos o sustancialmente similar al polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de referencia.

Como se aplica a polipéptidos, la expresión "similitud sustancial" o "sustancialmente similar" significa que dos secuencias de péptidos, cuando se alinean óptimamente, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT mediante el uso de ponderaciones de espacios predeterminados, comparten al menos un 95 % de identidad de secuencia, aun con mayor preferencia, al menos un 98 % o 99 % de identidad de secuencia. Preferentemente, las posiciones de residuos que no son idénticas difieren por sustituciones de aminoácidos conservadoras. Una "sustitución de aminoácidos conservadora" es aquella en la que un residuo de aminoácido es sustituido con otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral (grupo R) con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución de aminoácidos conservadora no modificará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En los casos en donde dos o más secuencias de aminoácidos difieren entre sí por las sustituciones conservadoras, el porcentaje de identidad de secuencia o grado de similitud puede ajustarse de manera ascendente para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. Los expertos en la técnica conocen los medios para realizar este ajuste. Ver, por ejemplo, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, incorporado en la presente descripción como referencia. Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen (1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; (2) cadenas laterales alifáticas de hidroxilo: serina y treonina; (3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; (4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina, y triptófano; (5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; (6) cadenas laterales ácidas: aspartato y glutamato, y (7) cadenas laterales que contienen azufre son cisteína y metionina. Los grupos de sustitución de aminoácidos conservadora preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato y asparagina-glutamina. Alternativamente, una sustitución conservadora es cualquier cambio que tenga un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250 descrita en Gonnet y otros, (1992) *Science* 256: 1443-1445, incorporada en la presente descripción como referencia. Una sustitución "moderadamente conservadora" es cualquier cambio que tenga un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250.

La similitud de secuencia para polipéptidos, que también se conoce como identidad de secuencia, se mide típicamente mediante el uso de un programa informático de análisis de secuencia. El programa informático de análisis de proteínas empareja secuencias similares mediante el uso de medidas de similitud asignadas a diversas sustituciones, deleciones y otras modificaciones, que incluyen las sustituciones de aminoácidos conservadoras. Por ejemplo, el programa informático GCG contiene programas, tales como Gap y Bestfit, que pueden usarse con parámetros predeterminados para determinar la homología de secuencia o la identidad de secuencia entre polipéptidos estrechamente relacionados, tales como polipéptidos homólogos de diferentes especies de organismos o entre una proteína de tipo silvestre y una mutéina de esta. Ver, por ejemplo, GCG Versión 6.1. Las secuencias de polipéptidos pueden compararse, además, mediante el uso de FASTA que usa parámetros predeterminados o recomendados, un programa en GCG Versión 6.1. FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) proporciona alineaciones y porcentajes de identidad de secuencia de las regiones de la mejor superposición entre la secuencia incógnita y la secuencia de búsqueda (Pearson (2000) supra). Otro algoritmo preferido cuando se compara una secuencia de la invención con una base de datos que contiene una gran cantidad de secuencias de diferentes organismos es el programa informático BLAST, en especial, BLASTP o TBLASTN, que usan parámetros predeterminados. Ver, por ejemplo, Altschul y otros, (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 and Altschul y otros, (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-402, cada una incorporada en la presente descripción como referencia.

Como se usa en la presente descripción, los términos "ácido nucleico" o "polinucleótidos" se refieren a nucleótidos y/o polinucleótidos, tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), oligonucleótidos, fragmentos generados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y fragmentos generados por ligación, escisión, acción de endonucleasa y acción de exonucleasa. Las moléculas de ácido nucleico pueden estar compuestas por monómeros que son nucleótidos de origen natural (tales como ADN y ARN) o análogos de nucleótidos de origen natural (por ejemplo, formas enantioméricas de nucleótidos de origen natural) o una combinación de ambos. Los nucleótidos modificados pueden tener alteraciones en las porciones de azúcar y/o en las porciones de bases de pirimidina o purina. Las modificaciones de azúcares incluyen, por ejemplo, la sustitución de uno o más grupos hidroxilo con halógenos, grupos alquilo, aminas y grupos azido, o los azúcares pueden funcionalizarse como éteres o ésteres. Además, la porción de azúcar completa puede

sustituirse con estructuras similares estérica y electrónicamente, tales como azúcares aza y análogos de azúcares carbocíclicos. Los ejemplos de modificaciones en una porción de base incluyen purinas y pirimidinas alquiladas, purinas o pirimidinas aciladas u otros sustitutos heterocíclicos bien conocidos. Los monómeros de ácido nucleico pueden unirse mediante enlaces fosfodiéster o análogos de tales enlaces. Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios.

El término "receptor antigénico quimérico" (CAR) se refiere a moléculas que combinan un dominio de unión contra un componente presente en la célula diana, por ejemplo, una especificidad basada en anticuerpos para un antígeno conveniente (por ejemplo, un antígeno tumoral, tal como BCMA) con un dominio intracelular que activa el receptor de células T para generar una proteína quimérica que exhibe una actividad inmunitaria celular específica anti-diana. Generalmente, los CAR consisten en un dominio extracelular de unión de anticuerpos de cadena simple (scFv) fusionado al dominio de señalización intracelular de la cadena zeta del complejo del receptor de antígeno de células T y tienen la capacidad, cuando se expresan en células T, de redirigir el reconocimiento de antígenos en base a la especificidad del anticuerpo monoclonal.

El término "vector", como se usa en la presente descripción, incluye, pero no se limita a, un vector viral, un plásmido, un vector de ARN o una molécula de ADN o ARN lineal o circular que puede consistir en ácidos nucleicos cromosómicos, no cromosómicos, semisintéticos o sintéticos. En algunos casos, los vectores son aquellos capaces de replicación autónoma (vector episomal) y/o de la expresión de ácidos nucleicos a los que están ligados (vectores de expresión). Los expertos en la técnica conocen un gran número de vectores adecuados, que están disponibles comercialmente. Los vectores virales incluyen retrovirus, adenovirus, parvovirus (por ejemplo, virus adenoasociados), coronavirus, virus de ARN de cadena negativa tales como ortomixovirus (por ejemplo, virus de la influenza), rabdovirus (por ejemplo, virus de la rabia y estomatitis vesicular), paramixovirus (por ejemplo, sarampión y Sendai), virus de ARN de cadena positiva tales como picornavirus y alfavirus, y virus de ADN de doble cadena que incluyen adenovirus, herpesvirus (por ejemplo, virus del herpes simple de tipos 1 y 2, virus de Epstein-Barr, citomegalovirus) y poxvirus (por ejemplo, vaccinia, viruela aviar y viruela del canario). Otros virus incluyen virus de Norwalk, togavirus, flavivirus, reovirus, papovavirus, hepadnavirus y virus de la hepatitis, por ejemplo. Los ejemplos de retrovirus incluyen: leucosis-sarcoma aviar, virus de tipo C de mamífero, virus de tipo B, virus de tipo D, grupo HTLV-BLV y lentivirus.

Un "dominio coestimulador" o "molécula coestimuladora" se refiere a la pareja de unión cognada en una célula T que se une específicamente con un ligando coestimulador, de esta manera se produce una respuesta coestimuladora por la célula, tal como, pero no limitada a la proliferación. Las moléculas coestimuladoras incluyen, pero no se limitan a, una molécula de MHC de clase I, BTLA y receptor de ligando Toll. Ejemplos de moléculas coestimuladoras incluyen CD27, CD28, CD8, 4-1BB (CD137) (SEQ ID NO: 99), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno 1 asociado a la función de los linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 y un ligando que se une específicamente con CD83 y similares. Una molécula coestimuladora es una molécula de la superficie celular distinta de un receptor de antígeno o sus ligandos que es necesaria para una respuesta inmunitaria eficaz.

Un "ligando coestimulador" se refiere a una molécula en una célula presentadora de antígeno que se une específicamente a una molécula coestimuladora cognada en una célula T, proporcionando de esta manera una señal que, además de la señal primaria proporcionada, por ejemplo, mediante la unión de un complejo TCR/CD3 con una molécula de MHC cargada con péptido, media una respuesta de células T, que incluye, pero no se limita a, activación de la proliferación, diferenciación y similares. Un ligando coestimulador puede incluir, pero no se limita a, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, ligando coestimulador inducible (ICOS-L), molécula de adhesión intercelular (ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, M1CB, HVEM, receptor de linfotoxina beta, 3/TR6, ILT3, ILT4, un agonista o anticuerpo que se une al receptor del ligando Toll y un ligando que se une específicamente con B7-H3.

Una "señal coestimuladora" se refiere a una señal que, en combinación con una señal primaria, tal como la ligadura de TCR/CD3, conduce a la proliferación de células T y/o a la regulación positiva o negativa de moléculas clave.

El término "dominio extracelular de unión a ligando", como se usa en la presente descripción, se refiere a un oligo o polipéptido que es capaz de unirse a un ligando, por ejemplo, una molécula de la superficie celular. Por ejemplo, el dominio extracelular de unión al ligando puede elegirse para reconocer un ligando que actúa como un marcador de superficie celular en células diana asociadas con un estado de enfermedad particular (por ejemplo, cáncer). Los ejemplos de marcadores de superficie celular que pueden actuar como ligandos incluyen aquellos asociados con infecciones virales, bacterianas y parasitarias, enfermedades autoinmunitarias y células cancerosas.

El término “sujeto” o “paciente”, como se usa en la presente descripción, incluye todos los miembros del reino animal, que incluye los primates no humanos y los seres humanos. En una modalidad, los pacientes son seres humanos con cáncer (por ejemplo, mieloma múltiple).

Un “dominio de transducción de la señal” o “dominio de señalización” de un CAR, como se usa en la presente descripción, es responsable de la señalización intracelular después de la unión de un dominio extracelular de unión de ligando a la diana lo que resulta en la activación de la célula inmunitaria y en la respuesta inmunitaria. En otras palabras, el dominio de transducción de señal es responsable de la activación de 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 una actividad auxiliar que incluye la secreción de citocinas. Por lo tanto, el término "dominio de transducción de señal" se refiere a la porción de una proteína que transduce la señal de la función efectora y dirige a la célula para que realice una función especializada. Los ejemplos de dominios de transducción de señal para usar en un CAR pueden ser las secuencias citoplasmáticas del receptor de células T y los correceptores que actúan en conjunto para iniciar la transducción de señales después del engranaje del receptor de antígeno, así como también cualquier derivado o variante de estas secuencias y cualquier secuencia sintética que tiene la misma capacidad funcional. En algunos casos, los dominios de señalización 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 secuencias de señalización citoplasmáticas primarias pueden comprender motivos de señalización que se conocen como motivos de activación de inmunorreceptores basados en tirosina de ITAM. Los ITAM son motivos de señalización bien definidos que se encuentran en la cola intracitoplasmática de una diversidad de receptores que sirven como sitios de unión para las tirosina quinasas de clase syk/zap70. Los ITAM ilustrativos incluyen los derivados de TCRzeta, FcRgamma, FcRbeta, FcRepsilon, CD3gamma, CD3delta, CD3epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. En algunas modalidades, el dominio de transducción de señal del CAR puede comprender el dominio de señalización de CD3zeta (SEQ ID NO: 100).

Receptores antigénicos Quiméricos (CAR)

Los receptores antigénicos quiméricos (CAR) redirigen la especificidad de las células T hacia antígenos reconocidos por los anticuerpos expresados en la superficie de las

células (por ejemplo, células cancerosas), mientras que los receptores de células T (TCR) amplían el rango de dianas para incluir antígenos intracelulares (por ejemplo, Antígenos tumorales).

Un aspecto de la presente invención incluye un receptor antigénico quimérico (CAR) que es específico para un antígeno de maduración de células B (BCMA) expresado en la superficie de células plasmáticas malignas. En una modalidad de la presente invención, un CAR como se describe en la presente descripción comprende un dominio extracelular de unión específico a la diana, un dominio transmembrana, un dominio de señalización intracelular (tal como un dominio de señalización derivado de CD3zeta o FcRgamma), y/o uno o más dominios de señalización coestimuladores derivados de una molécula coestimuladora, tal como, pero no limitado a, 4-1BB. En una modalidad, el CAR incluye una bisagra o región espaciadora entre el dominio de unión extracelular y el dominio transmembrana, tal como una bisagra CD8alfa.

El dominio de unión o el dominio extracelular del CAR proporciona al CAR la capacidad de unirse al antígeno diana de interés. Un dominio de unión (por ejemplo, un dominio de unión a ligando o dominio de unión a antígeno) puede ser cualquier proteína, polipéptido, oligopéptido o péptido que posea la capacidad de reconocer específicamente y unirse a una molécula biológica (por ejemplo, un receptor de superficie celular o proteína tumoral, o un componente de estos). Un dominio de unión incluye cualquier pareja de unión de origen natural, sintético, semisintético o producido de manera recombinante para una molécula biológica de interés. Por ejemplo, y como se describe adicionalmente en la presente descripción, un dominio de unión puede ser regiones variables de cadena ligera y cadena pesada de anticuerpo, o las regiones variables de cadena ligera y pesada pueden unirse en una sola cadena y en cualquier orientación (por ejemplo, VL-VH o VH-VL). Se conoce una diversidad de ensayos para identificar dominios de unión de la presente descripción que se unen específicamente con una diana particular, que incluyen transferencia Western, ELISA, citometría de flujo o análisis de resonancia de plasmones superficiales (por ejemplo, mediante el uso de análisis BIACORE). La diana puede ser un antígeno de interés clínico contra el cual sería conveniente desencadenar una respuesta inmunitaria efectora que resulte en la destrucción del tumor. En una modalidad, el antígeno diana del dominio de unión del receptor antigénico quimérico es una proteína BCMA sobre la superficie de las células tumorales, en particular, células tumorales de linaje de células B, tales como células de mieloma múltiple.

Los dominios de unión a ligandos ilustrativos incluyen proteínas de unión a antígenos,

tales como fragmentos de unión a antígenos de un anticuerpo, tales como scFv, scTCR, dominios extracelulares de receptores, ligandos para moléculas/receptores de superficie celular o dominios de unión a receptores de estos y proteínas de unión a tumores. En determinadas modalidades, los dominios de unión a antígeno incluidos en un CAR de la invención pueden ser una región variable (Fv), una CDR, un Fab, un scFv, una VH, una VL, un dominio variante de anticuerpo (dAb), un anticuerpo de camélido (VHH), una variante del dominio de fibronectina 3, una variante de repetición de anquirina y otro dominio de unión específico de antígeno derivado de otros andamios de proteínas.

En una modalidad, el dominio de unión del CAR es un anticuerpo de cadena única (scFv) anti-BCMA y puede ser un scFv murino, humano o humanizado. Los anticuerpos de cadena única pueden clonarse a partir de los genes de la región V de un hibridoma específico para una diana conveniente. Se ha descrito una técnica que puede usarse para clonar la cadena pesada de la región variable (VH) y la cadena ligera de la región variable (VL), por ejemplo, en Orlandi y otros, *PNAS*, 1989; 86: 3833-3837. Por lo tanto, en determinadas modalidades, un dominio de unión comprende un dominio de unión derivado de un anticuerpo, pero puede ser un dominio de unión no derivado de un anticuerpo. Un dominio de unión derivado de un anticuerpo puede ser un fragmento de un anticuerpo o un producto modificado genéticamente de uno o más fragmentos del anticuerpo, cuyo fragmento está involucrado en la unión con el antígeno.

En determinadas modalidades, los CAR de la presente invención pueden comprender un enlazador entre los diversos dominios, añadido para el espaciado y la conformación apropiados de la molécula. Por ejemplo, en una modalidad, puede haber un enlazador entre el dominio de unión VH o VL que puede tener entre 1 y 10 aminoácidos de longitud. En otras modalidades, el enlazador entre cualquiera de los dominios del receptor antigénico quimérico puede tener una longitud de entre 1 y 20 o 20 aminoácidos. En este sentido, el enlazador puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos de longitud. En modalidades adicionales, el enlazador puede tener 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 aminoácidos de longitud. Los intervalos que incluyen los números descritos en la presente descripción también se incluyen en la presente descripción, por ejemplo, un enlazador de 10-30 aminoácidos de longitud.

En determinadas modalidades, los enlazadores adecuados para usar en el CAR descrito en la presente descripción son enlazadores flexibles. Los enlazadores

adecuados pueden seleccionarse fácilmente y pueden ser de diferentes longitudes, tal como de 1 aminoácido (por ejemplo, Gly) a 20 aminoácidos, de 2 aminoácidos a 15 aminoácidos, de 3 aminoácidos a 12 aminoácidos, que incluye 4 aminoácidos a 10 aminoácidos, 5 aminoácidos a 9 aminoácidos, 6 aminoácidos a 8 aminoácidos o 7 aminoácidos a 8 aminoácidos, y pueden ser 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 aminoácidos.

Los enlazadores flexibles ilustrativos incluyen polímeros de glicina (G)_n, polímeros de glicina-serina, donde n es un número entero de al menos uno, polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina y otros enlazadores flexibles conocidos en la técnica. Los polímeros de glicina y glicina-serina están relativamente desestructurados y, por lo tanto, pueden servir como un enlace neutro entre dominios de proteínas de fusión tales como los CAR descritos en la presente descripción. La glicina accede significativamente a más espacio phi-psi que incluso la alanina, y está mucho menos restringida que los residuos con cadenas laterales más largas (ver Scheraga, *Rev. Computational Chem.* 11173-142 (1992)). El experto en la técnica reconocerá que el diseño de un CAR puede incluir enlazadores que son total o parcialmente flexibles, de manera que el enlazador puede incluir un enlazador flexible; así como también una o más porciones que confieren una estructura menos flexible para proporcionar una estructura CAR conveniente. Los enlazadores específicos incluyen enlazadores (G4S)_n, en donde n=1-3, como se muestra en las SEQ ID NO: 95-97, así como también el enlazador que se muestra en la SEQ ID NO: 96.

El dominio de unión del CAR puede ir seguido de un "espaciador" o "bisagra", que se refiere a la región que aleja el dominio de unión del antígeno de la superficie de la célula efectora para permitir el contacto adecuado entre célula y célula, la unión y activación del antígeno. (Patel y otros, *Gene Therapy*, 1999; 6: 412-419). La región de bisagra en un CAR se encuentra generalmente entre el dominio transmembrana (TM) y el dominio de unión. En determinadas modalidades, una región de bisagra es una región de bisagra de inmunoglobulina y puede ser una región de bisagra de inmunoglobulina de tipo silvestre o una región de bisagra de inmunoglobulina de tipo silvestre alterada. Otras regiones de bisagra ilustrativas usadas en los CAR descritos en la presente descripción incluyen la región de bisagra derivada de las regiones extracelulares de proteínas de membrana de tipo 1 tales como CD8alfa, CD4, CD28 y CD7, que pueden ser regiones de bisagra de tipo silvestre de estas moléculas o pueden estar alteradas. En una modalidad, la región de bisagra comprende una bisagra CD8alfa (SEQ ID NO: 97).

La región o dominio "transmembrana" es la parte del CAR que ancla la porción de

unión extracelular a la membrana plasmática de la célula efectora inmunitaria y facilita la unión del dominio de unión al antígeno diana. El dominio transmembrana puede ser un dominio transmembrana CD3zeta, sin embargo, otros dominios transmembrana que pueden emplearse incluyen los que se obtienen de CD8alfa, CD4, CD28, CD45, CD9, CD16, CD22, CD33, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 y CD154. En una modalidad, el dominio transmembrana es el dominio transmembrana de CD137. En algunas modalidades, el dominio transmembrana comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 98. En determinadas modalidades, el dominio transmembrana es sintético, en cuyo caso comprendería residuos predominantemente hidrófobos tales como leucina y valina.

El "dominio de señalización intracelular" o "dominio de señalización" se refiere a la parte de la proteína receptor del antígeno quimérico que participa en la transducción del mensaje de la unión de CAR eficaz a un antígeno diana en el interior de la célula efectora inmunitaria para provocar como respuesta la función de la célula efectora, por ejemplo, activación, producción de citocinas, proliferación y actividad citotóxica, que incluye la liberación de factores citotóxicos a la célula diana unida al CAR, u otras respuestas celulares provocadas como respuesta con la unión del antígeno al dominio extracelular del CAR. El término "función efectora" se refiere a una función especializada de la célula. La función efectora de la célula T, por ejemplo, puede ser actividad citolítica o actividad auxiliadora que incluye la secreción de una citocina. Por lo tanto, los términos "dominio de señalización intracelular" o "dominio de señalización", usados indistintamente en la presente descripción, se refieren a la parte de una proteína que transduce la señal de la función efectora y que dirige a la célula para que realice una función especializada. Aunque normalmente puede emplearse todo el dominio de señalización intracelular, en muchos casos no es necesario usar el dominio completo. En la medida en que se use una parte truncada de un dominio de señalización intracelular, tal parte truncada puede usarse en lugar del dominio completo siempre que transduzca la señal de la función efectora. El término dominio de señalización intracelular pretende incluir cualquier parte truncada del dominio de señalización intracelular suficiente para transducir la señal de la función efectora. El dominio de señalización intracelular se conoce, además como "dominio de transducción de señal" y normalmente se deriva de porciones de las cadenas FcRy o CD3 humanas.

Se conoce que las señales generadas solo a través del receptor de células T son insuficientes para la activación completa de las células T y que además se requiere

una señal secundaria o coestimuladora. Por lo tanto, puede decirse que la activación de las células T está mediada por dos clases distintas de secuencias de señalización citoplasmática: las que inician la activación primaria dependiente del antígeno a través del receptor de la célula T (secuencias de señalización citoplasmática primaria) y las que actúan de manera independiente del antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora (secuencias de señalización citoplasmática secundaria). Las secuencias de señalización citoplasmática que actúan de manera coestimuladora pueden contener motivos de señalización que se conocen como motivos de activación inmuno-receptores basados en tirosina o ITAM.

Los ejemplos de ITAM que contienen secuencias de señalización citoplasmática primarias que son de uso particular en la invención incluyen las derivadas de TCRzeta, FcRgamma, FcRbeta, CD3gamma, CD3delta, CD3epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. En una modalidad particular, el dominio de señalización intracelular de los CAR anti-BCMA descritos en la presente descripción se derivan de CD3zeta. En algunas modalidades, el dominio de señalización comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 100.

Como se usa en la presente descripción, el término "dominio de señalización coestimulador" o "dominio coestimulador", se refiere a la parte del CAR que comprende el dominio intracelular de una molécula coestimuladora. Las moléculas coestimuladoras son moléculas de la superficie celular distintas de los receptores antigénicos o receptores Fc que proporcionan una segunda señal necesaria para la activación y función eficaces de los linfocitos T después de unirse al antígeno. Los ejemplos de tales moléculas coestimuladoras incluyen CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), CD30, CD40, PD-1, ICOS (CD278), LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKD2C, B7-H2 y un ligando que se une específicamente a CD83. Por consiguiente, aunque la presente descripción proporciona dominios coestimuladores ilustrativos derivados de CD3zeta y 4-1BB, se contemplan otros dominios coestimuladores para usar con los CAR descritos en la presente descripción. La inclusión de uno o más dominios de señalización coestimuladores puede mejorar la eficacia y expansión de las células T que expresan receptores CAR. Los dominios de señalización intracelular y de señalización coestimuladora pueden enlazarse en cualquier orden en tándem al extremo carboxilo terminal del dominio transmembrana. En algunas modalidades, el dominio coestimulador comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 99. Aunque se ha demostrado que los CAR basados en scFv modificados genéticamente para contener un dominio de señalización de CD3 o FcRgamma suministran una señal

potente para la activación de las células T y la función efectora, no son suficientes para generar señales que promuevan la supervivencia y expansión de las células T en ausencia de una señal coestimuladora concomitante. Otros CAR que contienen un dominio de unión, una bisagra, un dominio transmembrana y el dominio de señalización derivado de CD3zeta o FcRgamma junto con uno o más dominios de señalización coestimuladores (por ejemplo, dominios coestimuladores intracelulares derivados de CD28, CD137, CD134 y CD278) pueden dirigir más eficazmente actividad antitumoral, así como también una mayor secreción de citocinas, actividad lítica, supervivencia y proliferación en células T que expresan CAR *in vitro*, y en modelos animales y pacientes con cáncer (Milone y otros, *Molecular Therapy*, 2009; 17: 1453-1464; Zhong y otros, *Molecular Therapy*, 2010; 18: 413-420; Carpenito y otros, *PNAS*, 2009; 106:3360-3365).

En diversas modalidades, los CAR de BCMA de la invención comprenden (a) un scFv anti-BCMA como dominio de unión (por ejemplo, un scFv que tiene regiones de unión (por ejemplo, CDR o dominios variables) de uno o más de los anticuerpos BCMA identificados en la Tabla 1) (b) una región bisagra derivada de CD8alfa humana, (c) un dominio transmembrana CD8alfa humana, y (d) un dominio de señalización intracelular de la cadena zeta (CD3) del receptor de células T humanas CD3, y opcionalmente uno o más dominios de señalización coestimuladores, por ejemplo, 4-1BB. En una modalidad, los diferentes dominios proteicos se organizan desde el extremo amino terminal al carboxilo terminal en el siguiente orden: dominio de unión, región bisagra y dominio transmembrana. El dominio de señalización intracelular y los dominios de señalización coestimuladores opcionales se unen al carboxilo terminal transmembrana en cualquier orden en tándem para formar un polipéptido quimérico de cadena única. En una modalidad, una construcción de ácido nucleico que codifica un BCMA CAR es una molécula de ácido nucleico quimérica que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende diferentes secuencias de codificación, por ejemplo, (5' a 3') las secuencias de codificación de un scFv anti-BCMA humano, una bisagra CD8alfa humana, un dominio transmembrana CD8alfa humano y un dominio de señalización intracelular CD3zeta. En otra modalidad, una construcción de ácido nucleico que codifica un CAR BCMA es una molécula de ácido nucleico quimérica que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende diferentes secuencias de codificación, por ejemplo, (5' a 3') las secuencias de codificación de un scFv anti-BCMA humano, una bisagra CD8alfa humana, un dominio transmembrana CD8alfa humano, un dominio coestimulador 4-1BB y un dominio coestimulador CD3zeta.

En determinadas modalidades, el polinucleótido que codifica el CAR descrito en la presente descripción se inserta en un vector. El vector es un vehículo en el que puede insertarse covalentemente un polinucleótido que codifica una proteína para provocar la expresión de esa proteína y/o la clonación del polinucleótido. Tales vectores también pueden denominarse "vectores de expresión". El polinucleótido aislado puede insertarse en un vector mediante el uso de cualquier método adecuado conocido en la técnica, por ejemplo, sin limitación, el vector puede digerirse mediante el uso de enzimas de restricción apropiadas y después puede ligarse con el polinucleótido aislado que tiene extremos de restricción coincidentes. Los vectores de expresión tienen la capacidad de incorporar y expresar secuencias de ácido nucleico heterólogas o modificadas que codifican al menos parte de un producto génico capaz de transcribirse en una célula. En la mayoría de los casos, las moléculas de ARN después se traducen en una proteína. Los vectores de expresión pueden contener una diversidad de secuencias de control, que se refieren a secuencias de ácido nucleico necesarias para la transcripción y posiblemente la traducción de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo huésped particular. Además de las secuencias de control que gobiernan la transcripción y la traducción, los vectores y los vectores de expresión pueden contener secuencias de ácido nucleico que también sirven para otras funciones y se comentan más adelante. Un vector de expresión puede comprender elementos adicionales, por ejemplo, el vector de expresión puede tener dos sistemas de replicación, lo que permite que se mantenga en dos organismos, por ejemplo, en células humanas para la expresión y en un huésped procariota para clonación y amplificación.

El vector de expresión puede tener los elementos reguladores necesarios en dirección 5' y en dirección 3' tales como secuencias promotoras como los promotores de CMV, PGK y EF1alfa, caja TATA de unión y reconocimiento de ribosomas, y secuencia de terminación de la transcripción 3' UTR AAUAAA para la transcripción y traducción génica eficiente en su respectiva célula huésped. Otros promotores adecuados incluyen el promotor constitutivo del promotor temprano del virus de simio 40 (SV40), el virus del tumor mamario de ratón (MMTV), el promotor LTR del VIH, el promotor MoMuLV, el promotor del virus de la leucemia aviar, el promotor temprano inmediato del EBV y el promotor del virus del sarcoma de Rous. Pueden usarse, además, promotores de genes humanos, que incluyen, pero no se limitan a, el promotor de actina, el promotor de miosina, el promotor de hemoglobina y el promotor de creatina quinasa. En determinadas modalidades, se contemplan, además, los promotores

inducibles como parte de los vectores que expresan el receptor antigénico quimérico. Esto proporciona un interruptor molecular capaz de activar la expresión de la secuencia de polinucleótidos de interés o desactivar la expresión. Los ejemplos de promotores inducibles incluyen, pero no se limitan a, un promotor de metalotionina, un promotor de glucocorticoides, un promotor de progesterona o un promotor de tetraciclina.

El vector de expresión puede tener una secuencia adicional tal como etiquetas 6x-histidina, c-Myc y FLAG que se incorporan en los CAR expresados. Por lo tanto, el vector de expresión puede diseñarse para que contenga secuencias reguladoras no traducidas 5' y 3' que a veces pueden funcionar como secuencias potenciadoras, regiones promotoras y/o secuencias terminadoras que pueden facilitar o mejorar la eficiencia de la transcripción del ácido nucleico de interés que porta el vector de expresión. Además, un vector de expresión puede modificarse genéticamente para la replicación y/o la funcionalidad de expresión (por ejemplo, transcripción y traducción) en un tipo de célula, ubicación celular o tipo de tejido en particular. Los vectores de expresión pueden incluir un marcador de selección para el mantenimiento del vector en la célula huésped o receptora.

En diversas modalidades, los vectores son plásmidos, secuencias de replicación autónoma y elementos transponibles. Los vectores ilustrativos adicionales incluyen, sin limitación, plásmidos, fagémidos, cósmidos, cromosomas artificiales tales como el cromosoma artificial de levadura (YAC), el cromosoma artificial bacteriano (BAC), o el cromosoma artificial derivado de P1 (PAC), bacteriófagos tales como fago lambda o fago M13 y virus animales. Los ejemplos de categorías de virus animales útiles como vectores incluyen, sin limitación, retrovirus (que incluye lentivirus), adenovirus, virus adenoasociado, herpesvirus (por ejemplo, virus del herpes simple), poxvirus, baculovirus, papilomavirus y papovavirus (por ejemplo, SV40). Los ejemplos de vectores de expresión son los vectores del Sistema de Expresión Bicistrónico (Neo) Lenti-X™ (Clontech), los vectores pCIneo (Promega) para la expresión en células de mamífero; pLenti4/V5-DEST.TM., pLenti6/V5-DEST.TM., y pLenti6.2N5-GW/lacZ (Invitrogen) para la transferencia de genes mediada por lentivirus y la expresión en células de mamífero. Las secuencias codificantes de los CAR descritas en la presente descripción pueden ligarse en dichos vectores de expresión para la expresión de la proteína quimérica en células de mamífero.

En determinadas modalidades, los ácidos nucleicos que codifican el CAR de la presente invención se proporcionan en un vector viral. Un vector viral puede ser el

derivado de retrovirus, lentivirus o virus espumoso. Como se usa en la presente descripción, el término "vector viral" se refiere a una construcción de vector de ácido nucleico que incluye al menos un elemento de origen viral y tiene la capacidad de empaquetarse en una partícula de vector viral. El vector viral puede contener la secuencia codificante de las diversas proteínas quiméricas descritas en la presente descripción en lugar de genes virales no esenciales. El vector y/o la partícula pueden utilizarse con el fin de transferir ADN, ARN u otros ácidos nucleicos a las células *in vitro* o *in vivo*. En la técnica se conocen numerosas formas de vectores virales.

En determinadas modalidades, el vector viral que contiene la secuencia codificante de un CAR descrito en la presente descripción es un vector retroviral o un vector lentiviral. El término "vector retroviral" se refiere a un vector que contiene elementos genéticos estructurales y funcionales que se derivan principalmente de un retrovirus. El término "vector lentiviral" se refiere a un vector que contiene elementos genéticos estructurales y funcionales fuera de las LTR que se derivan principalmente de un lentivirus.

Los vectores retrovirales para usar en la presente descripción pueden derivarse de cualquier retrovirus conocido (por ejemplo, retrovirus de tipo c, tal como el virus del sarcoma murino de Moloney (MoMSV), el virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), el virus del tumor mamario murino (MuMTV), el virus de la leucemia del mono gibbon (GaLV), el virus de la leucemia felina (FLV), el virus espumoso, Friend, Virus de Células Madre Murinas (MSCV) y Virus del Sarcoma de Rous (RSV)). Los retrovirus "de la invención incluyen, además, el virus de leucemia de células T humanas, HTLV-1 y HTLV-2, y la familia lentiviral de retrovirus, tales como Virus de Inmunodeficiencia Humana, HIV-1, HIV-2, virus de inmunodeficiencia de simios (SIV), virus de la inmunodeficiencia felina (FIV), virus de la inmunodeficiencia equina (EIV) y otras clases de retrovirus.

Un vector lentiviral para usar en la presente descripción se refiere a un vector derivado de un lentivirus, un grupo (o género) de retrovirus que dan lugar a una enfermedad de desarrollo lento. Los virus incluidos dentro de este grupo incluyen el HIV (virus de inmunodeficiencia humana; que incluye el HIV tipo 1 y el HIV tipo 2); visna-maedi; un virus de la artritis-encefalitis caprina; virus de la anemia infecciosa equina; virus de inmunodeficiencia felina (FIV); virus de la inmunodeficiencia bovina (BIV); y virus de inmunodeficiencia de simios (SIV). La preparación del lentivirus recombinante puede lograrse mediante el uso de los métodos de acuerdo con Dull y otros, and Zufferey y otros, (Dull y otros, *J. Virol.*, 1998; 72: 8463-8471 y Zufferey y otros, *J. Virol.* 1998; 72:9873-9880).

Los vectores retrovirales (*es decir*, tanto los lentivirales como no lentivirales) para usar en la presente invención pueden formarse mediante el uso de técnicas de clonación estándar combinando las secuencias de ADN convenientes en el orden y la orientación descritos en la presente descripción (Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F. M. y otros, (eds.) Greene Publishing Associates, (1989), Sections 9.10-9.14 y otros manuales estándar de laboratorio; Eglitis, y otros, (1985) *Science* 230:1395-1398; Danos and Mulligan (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6460-6464; Wilson y otros, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:3014-3018; Armentano y otros, (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6141-6145; Huber y otros, (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8039-8043; Ferry y otros, (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8377-8381; Chowdhury y otros, (1991) *Science* 254:1802-1805; van Beusechem y otros, (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7640-7644; Kay y otros, (1992) *Human Gene Therapy* 3:641-647; Dai y otros, (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10892-10895; Hwu y otros, (1993) *J. Immunol* 150:4104-4115; Patente de los EE.UU. núm. 4,868,116; Patente de los EE.UU. núm. 4,980,286; Solicitud PCT WO 89/07136; Solicitud PCT WO 89/02468; Solicitud PCT WO 89/05345; y Solicitud PCT WO 92/07573).

Las fuentes adecuadas para obtener secuencias retrovirales (*es decir*, tanto lentivirales como no lentivirales) para usar en la formación de vectores incluyen, por ejemplo, ARN genómico y ADNc disponibles de fuentes comercialmente disponibles, que incluye la Colección de Tipos de Cultivos (ATCC), Rockville, Maryland. Las secuencias también pueden sintetizarse químicamente.

Para la expresión de un CAR de BCMA, el vector puede introducirse en una célula huésped para permitir la expresión del polipéptido dentro de la célula huésped. Los vectores de expresión pueden contener una diversidad de elementos para controlar la expresión, que incluyen, sin limitación, secuencias promotoras, secuencias de inicio de la transcripción, secuencias potenciadoras, marcadores de selección y secuencias señal. Estos elementos pueden seleccionarse según sea apropiado por un experto en la técnica, como se describió anteriormente. Por ejemplo, las secuencias promotoras pueden seleccionarse para promover la transcripción del polinucleótido en el vector. Las secuencias promotoras adecuadas incluyen, sin limitación, el promotor de T7, el promotor de T3, el promotor de SP6, el promotor de beta-actina, el promotor de EF1a, el promotor de CMV y el promotor de SV40. Pueden seleccionarse secuencias potenciadoras para potenciar la transcripción del polinucleótido. Pueden seleccionarse marcadores de selección para permitir la selección de las células huésped insertadas

con el vector de aquellas que no, por ejemplo, los marcadores de selección pueden ser genes que confieren resistencia a antibióticos. Pueden seleccionarse secuencias señal para permitir que el polipéptido expresado sea transportado fuera de la célula huésped.

Para la clonación del polinucleótido, el vector puede introducirse en una célula huésped (una célula huésped aislada) para permitir la replicación del propio vector y amplificar de esta manera las copias del polinucleótido que contiene. Los vectores de clonación pueden contener componentes de secuencia que generalmente incluyen, sin limitación, un origen de replicación, secuencias promotoras, secuencias de inicio de la transcripción, secuencias potenciadoras y marcadores de selección. Estos elementos pueden seleccionarse según sea apropiado por un experto en la técnica. Por ejemplo, el origen de replicación puede seleccionarse para promover la replicación autónoma del vector en la célula huésped.

En determinadas modalidades, la presente descripción proporciona células huésped aisladas que contienen los vectores proporcionados en la presente descripción. Las células huésped que contienen el vector pueden ser útiles en la expresión o clonación del polinucleótido contenido en el vector. Las células huésped adecuadas pueden incluir, sin limitación, células procariotas, células fúngicas, células de levadura o células eucariotas superiores tales como células de mamífero. Las células procariotas adecuadas para este propósito incluyen, sin limitación, eubacterias, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, Enterobacteriaceae tal como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como también *Bacilli* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis*, *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*.

Los CAR de la presente invención se introducen en una célula huésped mediante el uso de técnicas de transfección y/o transducción conocidas en la técnica. Como se usa en la presente descripción, los términos "transfección" y "transducción" se refieren a los procesos mediante los cuales se introduce una secuencia de ácido nucleico exógena en una célula huésped. El ácido nucleico puede integrarse en el ADN de la célula huésped o puede mantenerse extracromosómicamente. El ácido nucleico puede mantenerse transitoriamente o puede ser una introducción estable. La transfección puede realizarse mediante una diversidad de medios conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, la coprecipitación de ADN con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por polibreno,

electroporación, microinyección, fusión de liposomas, lipofección, fusión de protoplastos, infección retroviral y biolística. La transducción se refiere al suministro de un gen o genes mediante el uso de un vector viral o retroviral por medio de una infección viral en lugar de la transfección. En determinadas modalidades, los vectores retrovirales se transducen mediante el empaquetamiento de los vectores dentro de los viriones antes de entrar en contacto con una célula. Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un CAR BCMA transportado por un vector retroviral puede transducirse en una célula mediante infección e integración del provirus.

Como se usa en la presente descripción, el término "manipulado genéticamente" o "modificado genéticamente" se refiere a la adición de material genético adicional en forma de ADN o ARN en el material genético total de una célula. Los términos "células modificadas genéticamente", "células modificadas" y "células redirigidas" se usan indistintamente.

En particular, el CAR de la presente invención se introduce y expresa en células efectoras inmunitarias para redirigir su especificidad a un antígeno diana de interés, por ejemplo, una célula plasmática maligna, por ejemplo, mieloma múltiple.

La presente invención proporciona métodos para preparar las células efectoras inmunitarias que expresan el CAR como se describe en la presente descripción. En una modalidad, el método comprende transfectar o transducir células efectoras inmunitarias aisladas de un sujeto, tal como un sujeto que tiene una célula tumoral que expresa BCMA, de manera que las células efectoras inmunitarias expresan uno o más CAR como se describe en la presente descripción. En determinadas modalidades, las células efectoras inmunitarias se aíslan de un individuo y se modifican genéticamente sin manipulación adicional *in vitro*. Después, tales células pueden volverse a administrar directamente al individuo. En modalidades adicionales, las células efectoras inmunitarias primero se activan y estimulan para que proliferen *in vitro* antes de ser modificadas genéticamente para expresar un CAR. A este respecto, las células efectoras inmunitarias pueden cultivarse antes o después de modificarse genéticamente (*es decir*, transducidas o transfectadas para expresar un CAR como se describe en la presente descripción).

Antes de la manipulación *in vitro* o modificación genética de las células efectoras inmunitarias descritas en la presente descripción, la fuente de células puede obtenerse de un sujeto. En particular, las células efectoras inmunitarias para usar con los CAR como se describen en la presente descripción comprenden células T. Las células T pueden obtenerse de diversas fuentes, que incluye las células mononucleares de

sangre periférica, la médula ósea, el tejido de los ganglios linfáticos, la sangre del cordón umbilical, tejidos del timo, el tejido de un sitio de infección, la ascitis, el derrame pleural, el tejido del bazo y los tumores. En determinadas modalidades, las células T pueden obtenerse a partir de una unidad de sangre extraída del sujeto mediante el uso de cualquier número de técnicas conocidas por el experto, tal como la separación FICOLL. En una modalidad, las células de la sangre circulante de un individuo se obtienen por aféresis. El producto de aféresis, típicamente, contiene linfocitos, que incluye linfocitos T, monocitos, granulocitos, linfocitos B, otras células blancas nucleadas de la sangre, eritrocitos y plaquetas. En una modalidad, las células recolectadas por aféresis pueden lavarse para eliminar la fracción de plasma y colocar las células en un tampón o medio apropiado para su procesamiento posterior. En una modalidad de la invención, las células se lavan con PBS. En una modalidad alternativa, la solución de lavado carece de calcio y puede carecer de magnesio o puede carecer de muchos, sino de todos, los cationes divalentes. Como apreciarán los expertos en la técnica, una etapa de lavado puede realizarse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como mediante el uso de una centrífuga de flujo continuo semiautomatizada. Después del lavado, las células pueden suspenderse nuevamente en una diversidad de tampones biocompatibles u otra solución salina con o sin tampón. En determinadas modalidades, los componentes indeseables de la muestra de aféresis pueden eliminarse en el medio de cultivo donde se suspenden directamente las células.

En determinadas modalidades, las células T se aíslan de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante la lisis de los eritrocitos y mediante la eliminación de los monocitos, por ejemplo, mediante centrifugación a través de un gradiente PERCOLL™. Una subpoblación específica de células T, tal como las células T CD28+, CD4+, CD8+, CD45RA+ y CD45RO+, puede aislarse adicionalmente mediante técnicas de selección positiva o negativa. Por ejemplo, el enriquecimiento de una población de células T mediante selección negativa puede lograrse con una combinación de anticuerpos dirigidos a los marcadores de superficie únicos para las células seleccionadas negativamente. Un método para usar en la presente descripción es la clasificación y/o selección celular mediante inmunoadherencia magnética negativa o citometría de flujo que usa un cóctel de anticuerpos monoclonales dirigidos a marcadores de superficie celular presentes en las células seleccionadas negativamente. Por ejemplo, para enriquecer las células CD4+ mediante selección negativa, un cóctel de anticuerpos monoclonales incluye, típicamente, anticuerpos

contra CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR y CD8. La citometría de flujo y la clasificación de células también pueden usarse para aislar poblaciones de células de interés para usar en la presente invención.

Las PBMC pueden usarse directamente para la modificación genética con los CAR mediante el uso de métodos como se describe en la presente descripción. En determinadas modalidades, después del aislamiento de PBMC, los linfocitos T se aíslan adicionalmente y, en determinadas modalidades, tanto los linfocitos T citotóxicos como los auxiliares pueden clasificarse en subpoblaciones de células T vírgenes, de memoria y efectoras antes o después de la modificación genética y/o expansión. Las células CD8⁺ pueden obtenerse mediante el uso de métodos estándar. En algunas modalidades, las células CD8⁺ se clasifican además en células vírgenes, de memoria central y efectoras mediante la identificación de los antígenos de la superficie celular que están asociados con cada uno de esos tipos de células CD8⁺. En modalidades, las células T de memoria están presentes en los subconjuntos CD62L⁺ y CD62L⁻ de los linfocitos de sangre periférica CD8⁺. Las PBMC se clasifican en fracciones CD62L-CD8⁺ y CD62L⁺ CD8⁺ después de la tinción con anticuerpos anti-CD8 y anti-CD62L. En algunas modalidades, la expresión de marcadores fenotípicos de TCM de memoria central incluye CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 y CD127 y son negativos para la granzima B. En algunas modalidades, las células T de memoria central son células T CD45RO⁺, CD62L⁺, CD8⁺. En algunas modalidades, las células T efectoras son negativas para CD62L, CCR7, CD28 y CD127, y positivas para granzima B y perforina. En algunas modalidades, los linfocitos T CD8⁺ vírgenes se caracterizan por la expresión de marcadores fenotípicos de células T vírgenes que incluyen CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD127 y CD45RA.

En determinadas modalidades, las células T CD4⁺ se clasifican adicionalmente en subpoblaciones. Por ejemplo, las células auxiliares T CD4⁺ pueden clasificarse en células vírgenes, de memoria central y efectoras mediante la identificación de poblaciones de células que tienen antígenos de superficie celular. Los linfocitos CD4⁺ pueden obtenerse mediante métodos estándar. En algunas modalidades, los linfocitos T CD4⁺ vírgenes son células T CD45RO⁻, CD45RA⁺, CD62L⁺CD4⁺. En algunas modalidades, las células CD4⁺ de memoria central son positivas para CD62L y positivas para CD45RO. En algunas modalidades, las células efectoras CD4⁺ son negativas para CD62L y CD45RO.

Las células efectoras inmunitarias, tales como las células T, pueden modificarse genéticamente después del aislamiento mediante el uso de métodos conocidos, o las

células efectoras inmunitarias pueden activarse y expandirse (o diferenciarse en el caso de progenitores) *in vitro* antes de modificarse genéticamente. En otra modalidad, las células efectoras inmunitarias, tal como las células T, se modifican genéticamente con los receptores antigénicos quiméricos descritos en la presente descripción (por ejemplo, se transducen con un vector viral que comprende un ácido nucleico que codifica un CAR) y después se activan y se expanden *in vitro*. Los métodos para activar y expandir células T se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente de los EE.UU. núm. 6,905,874; patente de los EE.UU. núm. 6,867,041; patente de los EE.UU. núm. 6,797,514; y en el documento WO2012079000. Generalmente, tales métodos incluyen poner en contacto las PBMC o células T aisladas con un agente estimulante y un agente coestimulador, tal como anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, generalmente unidos a una perla u otra superficie, en un medio de cultivo con las citocinas apropiadas, tal como IL-2. Los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 unidos a la misma perla sirven como una célula presentadora de antígeno (APC) "sustituta". En otras modalidades, las células T pueden activarse y estimularse para proliferar con células alimentadoras y anticuerpos y citocinas apropiados mediante el uso de métodos tales como los descritos en la patente de los EE.UU. núm. 6,040,177; patente de los EE.UU. núm. 5,827,642; y en el documento WO2012129514.

La invención proporciona una población de células efectoras inmunitarias modificadas para el tratamiento de un paciente que tiene una neoplasia maligna causada por un tumor que expresa BCMA, por ejemplo, mieloma múltiple, las células efectoras inmunitarias modificadas comprenden un CAR de BCMA como se describe en la presente descripción.

Las células efectoras inmunitarias que expresan CAR preparadas como se describe en la presente descripción pueden utilizarse en métodos y composiciones para inmunoterapia adoptiva de acuerdo con técnicas conocidas, o variaciones de estas que serán evidentes para los expertos en la técnica basándose en la presente descripción. Ver, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de los EE.UU. núm. 2003/0170238 de Gruenberg y otros; ver, además, la patente de los EE.UU. núm. 4,690,915 de Rosenberg.

En algunas modalidades, las células se formulan mediante una primera cosecha de estas a partir de su medio de cultivo y después las células se lavan y se concentran en un medio y un sistema de recipiente adecuado para la administración (un portador "farmacéuticamente aceptable") en una cantidad eficaz para el tratamiento. El medio de infusión adecuado puede ser cualquier formulación de medio isotónico, típicamente,

solución salina normal, Normosol R (Abbott) o Plasma-Lyte A (Baxter), pero también puede utilizarse dextrosa al 5 % en agua o lactato de Ringer. El medio de infusión puede complementarse con albúmina de suero humano.

Una cantidad eficaz de células en la composición para el tratamiento es de al menos 2 células (por ejemplo, al menos 1 célula T de memoria central CD8+ y al menos 1 célula T auxiliar del subconjunto CD4+) o es típicamente mayor de 10^2 células, y hasta 10^6 hasta 10^8 o 10^9 células inclusive y puede ser más de 10^{10} células. El número de células dependerá del uso final para el que esté destinada la composición, así como del tipo de células incluidas en ella.

Las células pueden ser autólogas o heterólogas para el paciente sometido a terapia. Si es conveniente, el tratamiento puede incluir, además, la administración de mitógenos (por ejemplo, PHA) o linfocinas, citocinas y/o quimiocinas (por ejemplo, IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF- α , IL-18, and TNF- β , GM-CSF, IL-4, IL-13, Flt3-L, RANTES, MIP1 α , etcétera) como se describe en la presente descripción, para potenciar la inducción de la respuesta inmunitaria.

Las poblaciones de células efectoras inmunitarias que expresan el CAR de la presente invención pueden administrarse solas o como una composición farmacéutica en combinación con diluyentes y/o con otros componentes tales como IL-2 u otras citocinas o poblaciones celulares. Brevemente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender una población de células efectoras inmunitarias que expresan el CAR, tales como células T, como se describe en la presente descripción, en combinación con uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéutica o fisiológicamente aceptables. Tales composiciones pueden comprender tampones tales como solución salina tamponada neutra, solución salina tamponada con fosfato y similares; carbohidratos tales como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos tales como glicina; antioxidantes; agentes quelantes tales como EDTA o glutatión; adyuvantes (por ejemplo, hidróxido de aluminio); y conservantes. Las composiciones de la presente invención se formulan preferentemente para administración intravenosa.

La respuesta inmunitaria antitumoral inducida en un sujeto mediante la administración de células T que expresan el CAR descritas en la presente descripción mediante el uso de los métodos descritos en la presente descripción, u otros métodos conocidos en la técnica, puede incluir respuestas inmunitarias celulares mediadas por células T citotóxicas capaces de destruir células infectadas, células T reguladoras y respuestas de células T auxiliares. Pueden inducir, además, respuesta inmunitaria humoral,

mediadas principalmente por células T auxiliares capaces de activar células B, por lo tanto, conducir a la producción de anticuerpos. Pueden usarse una diversidad de técnicas para analizar el tipo de respuestas inmunitarias inducidas por las composiciones de la presente invención, que están bien descritas en la técnica; por ejemplo, *Current Protocols in Immunology*, Editado por: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober (2001) John Wiley & Sons, NY, N.Y.

Por lo tanto, la presente invención proporciona métodos para tratar a un individuo diagnosticado o sospechoso de tener, o en riesgo de desarrollar una neoplasia hematopoyética maligna caracterizada en parte por la acumulación anormal de células plasmáticas productoras de inmunoglobulina en la médula ósea, tal como en el mieloma múltiple, que comprende administrar al individuo una cantidad con eficacia terapéutica de las células efectoras inmunitarias que expresan el CAR como se describe en la presente descripción.

En una modalidad, la invención proporciona un método para tratar a un sujeto diagnosticado con un cáncer que expresa BCMA que comprende eliminar las células efectoras inmunitarias de un sujeto diagnosticado con un cáncer que expresa BCMA, modificar genéticamente dichas células efectoras inmunitarias con un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un receptor antigénico quimérico de la presente invención, de esta manera se produce una población de células efectoras inmunitarias modificadas, y administrar la población de células efectoras inmunitarias modificadas al mismo sujeto. En una modalidad, las células efectoras inmunitarias comprenden células T.

Los métodos para administrar las composiciones celulares descritas en la presente descripción incluyen cualquier método que sea eficaz que resulte en la reintroducción de células efectoras inmunitarias modificadas genéticamente *ex vivo*, que expresan directamente un CAR de la invención, en el sujeto o en la reintroducción de los progenitores modificados genéticamente de las células efectoras inmunitarias que al ser introducidas en un sujeto se diferencian en células efectoras inmunitarias maduras que expresan el CAR. Un método comprende transducir células T de sangre periférica *ex vivo* con una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la invención y retornar las células transducidas al sujeto.

Propiedades de Unión de los Receptores antigénicos Quiméricos y los Anticuerpos Correspondientes

Como se usa en la presente descripción, el término "unión", en el contexto de la unión de un receptor antigénico quimérico o un anticuerpo correspondiente a cualquiera de, por ejemplo, un antígeno predeterminado, tal como una proteína de superficie celular o un fragmento de esta, típicamente, se refiere a una interacción o asociación entre un mínimo de dos entidades o estructuras moleculares, tal como una interacción dominio de unión del antígeno:antígeno.

Por ejemplo, la afinidad de unión corresponde, típicamente, a un valor K_D de aproximadamente de 10^{-7} M o menos, tal como aproximadamente de 10^{-8} M o menos, tal como aproximadamente de 10^{-9} M o menos, cuando se determina, por ejemplo, mediante la tecnología de resonancia de plasmones superficiales (SPR) en un instrumento BIAcore 3000 que usa el antígeno como el ligando y el anticuerpo o el receptor antigénico quimérico como el analito (o antiligando). Las estrategias de unión basadas en células, tales como los ensayos de unión de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), también se usan de manera rutinaria, y los datos de FACS se correlacionan bien con otros métodos, tales como la unión competitiva de radioligandos y SPR (Benedict, CA, *J Immunol Methods*. 1997, 201(2):223-31; Geuijen, CA, y otros, *J Immunol Methods*. 2005, 302(1-2):68-77).

Por consiguiente, el receptor antigénico quimérico o el anticuerpo correspondiente de la invención se une al antígeno o molécula de superficie celular predeterminada (receptor) que tiene una afinidad correspondiente a un valor K_D que es al menos diez veces más bajo que su afinidad para unirse a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína). De acuerdo con la presente invención, la afinidad de un receptor antigénico quimérico o un anticuerpo correspondiente con un valor de K_D que es igual o menos de diez veces menor que un antígeno no específico puede considerarse como unión no detectable.

El término " K_D " (M) se refiere a la constante de disociación de equilibrio de una interacción particular dominio de unión a antígeno:antígeno, o la constante de disociación de equilibrio de un anticuerpo correspondiente a un antígeno. Existe una relación inversa entre K_D y la afinidad de unión, por lo tanto, cuanto más pequeño sea el valor K_D , la afinidad será mayor, es decir, más fuerte. Por lo tanto, las expresiones "afinidad más alta" o "afinidad más fuerte" se relacionan con una capacidad mayor para formar una interacción y, por lo tanto, un valor K_D menor, y, de manera inversa, las expresiones "afinidad más baja" o "afinidad más débil" se relacionan con una capacidad menor para formar una interacción y, por lo tanto, un valor K_D mayor. En algunas circunstancias, una mayor afinidad de unión (o K_D) de una molécula particular

(por ejemplo, un receptor antigénico quimérico o un anticuerpo correspondiente) a su molécula asociada interactiva (por ejemplo, antígeno X) en comparación con la afinidad de unión de la molécula (por ejemplo, un receptor antigénico quimérico o un anticuerpo correspondiente) a otra molécula asociada interactiva (por ejemplo, el antígeno Y) puede expresarse como una relación de unión determinada al dividir el valor K_D mayor (afinidad más baja o más débil) por el valor K_D menor (afinidad más alta o más fuerte), por ejemplo, expresada como afinidad de unión 5 veces o 10 veces mayor, según sea el caso.

El término " k_d " (sec^{-1} o $1/\text{s}$) se refiere a la constante de velocidad de disociación de una interacción particular dominio de unión a antígeno:antígeno, o la constante de velocidad de disociación de un receptor antigénico quimérico o un anticuerpo correspondiente. Dicho valor también se denomina valor k_{off} .

El término " k_a " ($\text{M}^{-1} \times \text{sec}^{-1}$ o $1/\text{M}$) se refiere a la constante de velocidad de asociación de una interacción particular dominio de unión a antígeno:antígeno, o la constante de velocidad de asociación de un receptor antigénico quimérico o un anticuerpo correspondiente.

El término " K_A " (M^{-1} o $1/\text{M}$) se refiere a la constante de equilibrio de asociación de una interacción particular dominio de unión a antígeno:antígeno, o la constante de equilibrio de asociación de un receptor antigénico quimérico o un anticuerpo correspondiente. La constante de equilibrio de asociación se obtiene dividiendo la k_a por la k_d .

El término " EC_{50} " o " EC_{50} " se refiere a la mitad de la máxima concentración eficaz, que incluye la concentración de un receptor antigénico quimérico que induce la mitad de la respuesta entre el valor inicial y el máximo después de un tiempo de exposición especificado. La EC_{50} representa esencialmente la concentración de un receptor antigénico quimérico donde se observa el 50 % de su efecto máximo. En determinadas modalidades, el valor de EC_{50} es igual a la concentración de un receptor antigénico quimérico o anticuerpo correspondiente de la invención que proporciona la mitad de la unión máxima a las células que expresan un antígeno (por ejemplo, un antígeno asociado a tumor, tal como BCMA), como se determina, por ejemplo, mediante un ensayo de unión FACS. Por lo tanto, se observa una unión reducida o más débil con una mayor EC_{50} , o valor de la mitad de la máxima concentración eficaz.

En una modalidad, la unión disminuida puede definirse como una EC_{50} aumentada del receptor antigénico quimérico o anticuerpo correspondiente que permite la unión de la mitad de la cantidad máxima a las células diana.

Variantes de Secuencia de los Receptores de Antígeno Quimérico

Los receptores de antígeno quimérico de la presente invención pueden comprender una o más sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos en las regiones de marco y/o CDR de los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera en comparación con las secuencias de la línea germinal correspondientes de las cuales se derivaron los dominios de unión al antígeno individuales de los anticuerpos correspondientes. Tales mutaciones pueden determinarse fácilmente mediante la comparación de las secuencias de aminoácidos descritas en la presente descripción con las secuencias de la línea germinal disponibles en, por ejemplo, bases de datos públicas de secuencias de anticuerpos. Los receptores de antígeno quimérico de la presente invención pueden comprender dominios de unión al antígeno que se derivan de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las región variable o CDR ilustrativas descritas en la presente descripción, en donde uno o más aminoácidos dentro de una o más regiones de marco y/o CDR están mutados con respecto a los residuos correspondientes de la secuencia de la línea germinal de la que deriva el anticuerpo correspondiente, o los residuos correspondientes de otra secuencia de la línea germinal humana, o a una sustitución conservadora de aminoácidos de los residuos correspondientes de la línea germinal (tales cambios de secuencia se denominan en la presente descripción colectivamente como "mutaciones de la línea germinal"). Un experto en la técnica, que comience con las secuencias de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera descritas en la presente descripción, puede producir fácilmente numerosos anticuerpos que comprenden una o más mutaciones de las líneas germinales individuales o combinaciones de estas. En determinadas modalidades, todos los residuos de marco y/o CDR dentro de los dominios V_H y/o V_L están mutados nuevamente con respecto a los residuos encontrados en la secuencia de la línea germinal original de la que el dominio de unión al antígeno se derivó originalmente. En otras modalidades, solo determinados residuos están mutados nuevamente con respecto a la secuencia original de la línea germinal, por ejemplo, solo los residuos mutados se encuentran dentro de los primeros 8 aminoácidos de FR1 o dentro de los últimos 8 aminoácidos de FR4, o solo los residuos mutados se encuentran dentro de CDR1, CDR2 o CDR3. En otras modalidades, uno o más de los residuos de marco y/o CDR están mutados con respecto a los residuos correspondientes de una secuencia de línea germinal diferente (es decir, una secuencia de línea germinal que es diferente de la secuencia de línea germinal de la cual el dominio de unión al antígeno deriva originalmente). Además, los dominios de

unión al antígeno pueden contener cualquier combinación de dos o más mutaciones de línea germinal dentro de las regiones de marco y/o CDR, por ejemplo, en donde determinados residuos individuales están mutados con respecto al residuo correspondiente de una secuencia de línea germinal particular, mientras que otros residuos distintos a la secuencia de la línea germinal original se mantienen o están mutados con respecto al residuo correspondiente de una secuencia de la línea germinal distinta.

Características Biológicas de los Receptores antigénicos Quiméricos y los Anticuerpos Correspondientes

La presente invención incluye receptores antigénicos quiméricos con dominios de unión a antígenos derivados de anticuerpos que se unen al BCMA humano con alta afinidad (por ejemplo, valores de K_D nanomolar o subnanomolar).

De acuerdo con determinadas modalidades, la presente invención incluye receptores antigénicos quiméricos con dominios de unión a antígenos derivados de los anticuerpos correspondientes que se unen al BCMA humano (por ejemplo, a 25 °C) con una K_D de menos de aproximadamente 5 nM como se mide mediante resonancia de plasmones superficiales. En determinadas modalidades, los anticuerpos correspondientes se unen a BCMA con una K_D de menos de aproximadamente 20 nM, menos de aproximadamente 10 nM, menos de aproximadamente 8 nM, menos de aproximadamente 7 nM, menos de aproximadamente 6 nM, menos de aproximadamente 5 nM, menos de aproximadamente 4 nM, menos de aproximadamente 3 nM, menos de aproximadamente 2 nM, menos de aproximadamente 1 nM, menos de aproximadamente 800 nM, menos de aproximadamente 700 nM, menos de aproximadamente 500 pM, menos de aproximadamente 400 pM, menos de aproximadamente 300 pM, menos de aproximadamente 200 pM, menos de aproximadamente 100 pM, menos de aproximadamente 50 pM o menos de aproximadamente 25 pM como se mide mediante resonancia de plasmones superficiales.

La presente invención incluye, además, receptores antigénicos quiméricos con dominios de unión a antígenos derivados de los anticuerpos correspondientes que se unen al BCMA con una vida media disociativa ($t_{1/2}$) mayor de aproximadamente 10 minutos o mayor de aproximadamente 125 minutos como se mide mediante resonancia de plasmones superficiales a 25 °C. En determinadas modalidades, los anticuerpos correspondientes se unen al BCMA con una $t_{1/2}$ de mayor que aproximadamente 3 minutos, mayor que aproximadamente 4 minutos, mayor que

aproximadamente de 10 minutos, mayor que aproximadamente 20 minutos, mayor que aproximadamente 30 minutos, mayor que aproximadamente 40 minutos, mayor que aproximadamente 50 minutos, mayor que aproximadamente 60 minutos, mayor que aproximadamente 70 minutos, mayor que aproximadamente 80 minutos, mayor que aproximadamente 90 minutos, mayor que aproximadamente 100 minutos, mayor que aproximadamente 110 minutos, o mayor que aproximadamente 120 minutos, como se mide mediante resonancia de plasmones superficiales a 25 °C.

La presente invención incluye, además, receptores antigénicos quiméricos con dominios de unión a antígenos derivados de los anticuerpos correspondientes que se unen específicamente a líneas celulares humanas que expresan el BCMA endógeno (por ejemplo, NCI-H929, MOLP-8 u OMP-2), como se determina mediante un ensayo de unión de FACS.

La presente invención incluye, además, células modificadas genéticamente que expresan receptores antigénicos quiméricos específicos de BCMA que (i) son activados por células que expresan BCMA y/o (ii) exhiben inhibición del crecimiento tumoral en ratones inmunodeprimidos que portan xenoinjertos de mieloma múltiple humano.

Preparación de los Dominios de Unión a Antígenos

Los dominios de unión a antígenos de los receptores antigénicos quiméricos de la presente invención, que son específicos para antígenos particulares (por ejemplo, BCMA), pueden prepararse mediante cualquier tecnología de generación de anticuerpos conocida en la técnica. En determinadas modalidades, uno o más de los componentes individuales (por ejemplo, cadenas pesadas y ligeras) de los anticuerpos correspondientes de la invención se derivan de anticuerpos quiméricos, humanizados o completamente humanos. Los métodos para producir tales anticuerpos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, una o más de las cadenas pesadas y/o ligeras pueden prepararse mediante el uso de la tecnología VELOCIMMUNE™. Mediante el uso de la tecnología VELOCIMMUNE™ (o cualquier otra tecnología para la generación de anticuerpos humanos), los anticuerpos quiméricos de alta afinidad para un antígeno particular (por ejemplo, BCMA) se aíslan inicialmente y tienen una región variable humana y una región constante de ratón. Los anticuerpos se caracterizan y se seleccionan por características convenientes, que incluyen afinidad, selectividad, epítipo, etcétera. Como se discute en la presente descripción, estas regiones variables humanas (o CDR) pueden incorporarse después en los dominios de unión a antígenos de los receptores antigénicos quiméricos.

Polinucleótidos y Vectores

La presente invención se refiere, además, a polinucleótidos y vectores que codifican los receptores antigénicos quiméricos discutidos en la presente descripción.

En diversas modalidades, el polinucleótido puede comprender un casete de expresión o un vector de expresión (por ejemplo, un plásmido para la introducción en una célula huésped bacteriana, o un vector viral tal como un vector de baculovirus para la transfección de una célula huésped de insecto, o un plásmido o vector viral tal como un lentivirus para la transfección de una célula huésped de mamífero).

En diversas modalidades, los polinucleótidos y/o vectores comprenden una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87 o SEQ ID NO: 89. En diversas modalidades, los polinucleótidos y/o vectores comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, o SEQ ID NO: 90. En diversas modalidades, los polinucleótidos y/o vectores comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99 o SEQ ID NO: 100.

Métodos para la Modificación Genética de las Células Inmunitarias que Expresan Receptores antigénicos Quiméricos

La presente invención abarca métodos para preparar células inmunitarias para inmunoterapia que comprenden introducir, *ex vivo*, en tales células inmunitarias los polinucleótidos o vectores que codifican uno de los receptores antigénicos quiméricos específicos de BCMA descritos en la presente descripción.

La presente invención incluye, además, células inmunitarias que comprenden un polinucleótido o vector lentiviral que codifica uno de los receptores antigénicos quiméricos específicos del BCMA discutidos en la presente descripción. En algunas modalidades, estas células inmunitarias se usan para inmunoterapia (por ejemplo, tratamiento de cáncer).

La presente invención abarca, además, métodos para la modificación genética de células inmunitarias para hacerlas más adecuadas para el trasplante alogénico. De acuerdo con un primer aspecto, la célula inmunitaria puede hacerse alogénica, por ejemplo, mediante la inactivación de al menos un gen que expresa uno o más componentes del receptor de células T (TCR) como se describe en el documento WO 2013/176915, que puede combinarse con la inactivación de un gen que codifica o regula la expresión de la proteína HLA o $\beta 2m$. En consecuencia, el riesgo de síndrome

de injerto contra huésped y rechazo del injerto se reducen significativamente. De acuerdo con otro aspecto de la invención, las células inmunitarias pueden manipularse posteriormente para hacerlas más activas o limitar el agotamiento, mediante la inactivación de genes que codifican proteínas que actúan como "puntos de control inmunitarios" que actúan como reguladores de la activación de las células T, tales como PD1 o CTLA-4.

Células inmunitarias Modificadas Genéticamente

Las células inmunitarias que comprenden un receptor antigénico quimérico de la invención (o células inmunitarias modificadas genéticamente) son otro objeto de la presente invención. En algunos casos, la célula inmunitaria es una célula efectora inmunitaria. En algunos casos, la célula inmunitaria es una célula T. En algunos casos, la célula inmunitaria es un linfocito T seleccionado de un linfocito T inflamatorio, un linfocito T citotóxico, un linfocito T regulador o un linfocito T auxiliar. En algunos casos, la célula inmunitaria es un linfocito T citotóxico CD8+.

En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada genéticamente es una célula T humana que comprende un receptor antigénico quimérico que comprende, desde el extremo N terminal al extremo C terminal: (a) un dominio extracelular de unión a ligando que comprende un dominio del fragmento variable de cadena única anti-BCMA (scFv) que comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) y una región variable de cadena pesada (HCVR); (b) una bisagra; (c) un dominio transmembrana; y (d) un dominio citoplasmático que comprende un dominio coestimulador y un dominio de señalización.

En algunas modalidades, el dominio scFv de la célula T humana modificada genéticamente comprende un par de secuencias de aminoácidos LCVR/HCVR que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 10/2, 26/18, 42/34, 58/50, o 74/66. En algunos casos, la bisagra comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 97. En algunos casos, el dominio transmembrana comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 98. En algunos casos, el dominio coestimulador es un dominio coestimulador 4-1BB. En algunos casos, el dominio coestimulador 4-1BB comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 99. En algunos casos, el dominio de señalización es un dominio de señalización de CD3zeta. En algunos casos, el dominio de señalización CD3zeta comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 100.

En diversas modalidades, la célula T humana modificada genéticamente comprende un receptor antigénico quimérico que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, o SEQ ID NO: 90.

Bioequivalentes

La presente invención abarca receptores antigénicos quiméricos y células modificadas genéticamente que expresan los receptores antigénicos quiméricos, que tienen secuencias de aminoácidos que varían de aquellas de las moléculas ilustrativas descritas en la presente descripción, pero que retienen la capacidad de unirse al BCMA, activar células inmunitarias que expresan los receptores antigénicos quiméricos en la presencia de células que expresan BCMA, o suprimir el crecimiento o la proliferación de células tumorales que expresan BCMA. Tales moléculas variantes pueden comprender una o más adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos cuando se comparan con la secuencia de origen, pero muestran actividad biológica que es esencialmente equivalente a aquella de las moléculas biespecíficas de unión al antígeno descritas.

En una modalidad, dos células inmunitarias modificadas genéticamente que expresan un receptor antigénico quimérico de la presente invención son bioequivalentes si no existen diferencias clínicamente significativas en su seguridad, pureza y potencia.

En una modalidad, dos células inmunitarias modificadas genéticamente son bioequivalentes si un paciente puede cambiar una o más veces entre el producto de referencia y el producto biológico sin un aumento esperado del riesgo de efectos adversos, que incluyen un cambio clínicamente significativo en la inmunogenicidad o una eficacia disminuida, en comparación con la terapia continua sin tal cambio.

En una modalidad, dos células inmunitarias modificadas genéticamente son bioequivalentes si ambas actúan mediante un mecanismo o mecanismos de acción común para la afección o afecciones de uso, en la medida en que tales mecanismos son conocidos.

La bioequivalencia puede demostrarse mediante métodos in vivo e in vitro. Las medidas de bioequivalencia incluyen, por ejemplo, (a) una prueba in vivo en humanos u otros mamíferos, en donde la concentración de las células modificadas genéticamente se mide en sangre, plasma, suero u otro fluido biológico en función del tiempo; (b) una prueba in vitro que se correlaciona con y es razonablemente predictiva de los datos de biodisponibilidad in vivo en humanos; (c) una prueba in vivo en humanos u otros mamíferos en donde el efecto farmacológico agudo adecuado de la célula modificada genéticamente (o su diana) se mide en función del tiempo; y (d) en

un ensayo clínico bien controlado que establece la seguridad, eficacia o biodisponibilidad o bioequivalencia de una célula modificada genéticamente.

Las variantes bioequivalentes de las células modificadas genéticamente ilustrativas expuestas en la presente descripción pueden construirse mediante, por ejemplo, realizando diversas sustituciones de residuos o secuencias o mediante la eliminación de secuencias o residuos terminales o internos que no son necesarios para la actividad biológica.

Selectividad de Especies y Reactividad Cruzada de Especies

De acuerdo con determinadas modalidades de la invención, se proporcionan dominios de unión a antígeno que se unen a BCMA humano, pero no a BCMA de otras especies. La presente invención también incluye dominios de unión a antígenos que se unen al BCMA humano y al BCMA de una o más especies no humanas.

De acuerdo con determinadas modalidades ilustrativas de la invención, se proporcionan dominios de unión a antígeno que se unen a BCMA humano y que pueden unirse o no, según sea el caso, a uno o más de BCMA de ratón, rata, cobayo, hámster, gerbo, cerdo, gato, perro, conejo, cabra, oveja, vaca, caballo, camello, cynomolgus, mono tití, macaco de la India o chimpancé.

Activación y Expansión de Células Inmunitarias Modificadas Genéticamente

Ya sea antes o después de la modificación genética de las células modificadas (por ejemplo, células T), incluso si las células inmunitarias modificadas genéticamente de la presente invención se activan y proliferan independientemente de los mecanismos de unión al antígeno, las células inmunitarias, en particular las células T de la presente invención, pueden activarse y expandirse adicionalmente generalmente mediante el uso de los métodos como se describe, por ejemplo, en las patentes de los EE.UU. Núms. 6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358; 6,887,466; 6,905,681; 7,144,575; 7,067,318; 7,172,869; 7,232,566; 7,175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; 6,867,041; y en la publicación de solicitud de patente de los EE.UU. núm. 20060121005. Las células T pueden expandirse *in vitro* o *in vivo*.

Generalmente, las células T de la invención se expanden por contacto con un agente que estimula un complejo CD3 TCR y una molécula coestimuladora en la superficie de las células T para crear una señal de activación para la célula T. Por ejemplo, pueden usarse productos químicos tales como el ionóforo de calcio A23187, el 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA) o lectinas mitogénicas como la fitohemaglutinina (PHA) para crear una señal de activación para la célula T.

Como ejemplos no limitantes, las poblaciones de células T pueden estimularse *in vitro*, por ejemplo, tal como por contacto con un anticuerpo anti-CD3, o un fragmento de unión a antígeno de este, o un anticuerpo anti-CD2 inmovilizado en una superficie, o por contacto con un activador de la proteína quinasa C (por ejemplo, briostatina) junto con un ionóforo de calcio. Para la coestimulación de una molécula accesoria en la superficie de las células T, se usa un ligando que se une a la molécula accesoria. Por ejemplo, una población de células T puede ponerse en contacto con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28, en condiciones apropiadas para estimular la proliferación de las células T. Las condiciones apropiadas para el cultivo de células T incluyen un medio apropiado (por ejemplo, Medio Mínimo Esencial o Medio RPMI 1640 o, X-vivo 5, (Lonza)) que pueden contener factores necesarios para la proliferación y viabilidad, que incluye suero (por ejemplo, suero fetal bovino o humano), interleucina-2 (IL-2), insulina, IFN- γ , 1L-4, 1L-7, GM-CSF, IL-10, IL-2, 1L-15, TGF β y TNF- α o cualquier otro aditivo para el crecimiento de células conocido por el experto en la técnica. Otros aditivos para el crecimiento de células incluyen, pero no se limitan a, tensioactivo, plasmanato y agentes reductores tales como N-acetil-cisteína y 2-mercaptoetanol. Los medios pueden incluir RPMI 1640, A1M-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 1, y X-Vivo 20, Optimizer, con aminoácidos agregados, piruvato de sodio y vitaminas, ya sea sin suero o suplementado con una cantidad apropiada de suero (o plasma) o un conjunto definido de hormonas, y/o una cantidad de citocinas suficiente para el crecimiento y la expansión de las células T. Los antibióticos, por ejemplo, penicilina y estreptomina, se incluyen solo en cultivos experimentales, no en cultivos de células que van a infundirse en un sujeto. Las células diana se mantienen en las condiciones necesarias para soportar el crecimiento, por ejemplo, una temperatura adecuada (por ejemplo, 37 °C) y una atmósfera (por ejemplo, aire más 5 % de O₂). Las células T que se han expuesto a distintos tiempos de estimulación pueden presentar características diferentes.

En otra modalidad particular, dichas células pueden expandirse mediante cultivo conjunto con tejido o células. Además, dichas células pueden expandirse *in vivo*, por ejemplo, en la sangre del sujeto después de administrar dicha célula al sujeto.

Aplicaciones Terapéuticas

La presente invención incluye composiciones que comprenden una célula modificada genéticamente (por ejemplo, una célula T) que expresa un receptor antigénico quimérico de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunos casos, las células modificadas genéticamente forman un medicamento,

particularmente para la inmunoterapia. En algunos casos, las células modificadas genéticamente se usan para el tratamiento del cáncer (por ejemplo, mieloma múltiple). En algunos casos, las células modificadas genéticamente se utilizan en la fabricación de un medicamento para inmunoterapia y/o el tratamiento de un cáncer (por ejemplo, un cáncer que expresa BCMA).

La presente invención incluye métodos que comprenden administrar a un sujeto que lo necesite una composición terapéutica que comprende una célula modificada genéticamente (por ejemplo, una célula T) que expresa un receptor antigénico quimérico como se discute en la presente descripción. La composición terapéutica puede comprender una célula que exprese cualquier receptor antigénico quimérico como se describe en la presente descripción y un portador, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en la presente descripción, la expresión "un sujeto que lo necesita" significa un animal humano o no humano que presenta uno o más síntomas o indicios de cáncer (por ejemplo, un sujeto que expresa un tumor o que padece de cualquiera de los tipos de cáncer mencionados en la presente descripción), o que de cualquier otra manera se beneficiaría de una inhibición o reducción de la actividad de BCMA o una disminución de las células BCMA+ (por ejemplo, células de mieloma múltiple).

Las células modificadas genéticamente de la presente invención son útiles, entre otros, para el tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno en el que la estimulación, la activación y/o el direccionamiento de una respuesta inmunitaria serían beneficiosos. En particular, las células modificadas genéticamente de la presente invención pueden usarse para el tratamiento, prevención y/o mejora de cualquier enfermedad o trastorno asociado o mediado por la expresión de BCMA o la actividad o proliferación de células BCMA+. Las células que expresan BCMA que pueden inhibirse o destruirse mediante el uso de las células modificadas genéticamente de la invención incluyen, por ejemplo, células de mieloma múltiple.

Las células modificadas genéticamente de la presente invención pueden usarse para tratar una enfermedad o trastorno asociado con la expresión de BCMA que incluye, por ejemplo, un cáncer que incluye mieloma múltiple u otros cánceres de células B o de células plasmáticas, tales como macroglobulinemia de Waldenström, linfoma de Burkitt y linfoma difuso de células B grandes. En algunas modalidades, la enfermedad o trastorno que expresa BCMA es la enfermedad de Castleman, linfoma linfoplasmocítico, linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma de zona marginal, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin o leucemia linfocítica crónica. De

acuerdo con determinadas modalidades de la presente invención, las células modificadas genéticamente son útiles para tratar a un paciente afectado con mieloma múltiple. De acuerdo con otras modalidades relacionadas de la invención, se proporcionan métodos que comprenden administrar una célula modificada genéticamente como se describe en la presente descripción a un paciente afectado con mieloma múltiple. Los métodos analíticos/diagnósticos conocidos en la técnica, tales como barrido de tumores, etcétera, pueden usarse para determinar si un paciente tiene mieloma múltiple u otro cáncer del linaje de células B.

La presente invención incluye, además, métodos para el tratamiento del cáncer residual en un sujeto. Como se usa en la presente descripción, la expresión "cáncer residual" significa la existencia o persistencia de una o más células cancerosas en un sujeto después del tratamiento con una terapia contra el cáncer.

De acuerdo con determinados aspectos, la presente invención proporciona métodos para tratar una enfermedad o trastorno asociado con la expresión de BCMA (por ejemplo, mieloma múltiple) que comprenden administrar una población de células modificadas genéticamente descritas en otra parte de la presente descripción a un sujeto después que se ha determinado que el sujeto tiene mieloma múltiple. Por ejemplo, la presente invención incluye métodos para tratar el mieloma múltiple que comprenden administrar células inmunitarias modificadas genéticamente a un paciente 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas o 4 semanas, 2 meses, 4 meses, 6 meses, 8 meses, 1 año o más después de que el sujeto recibió otra inmunoterapia o quimioterapia.

Los tratamientos discutidos en la presente descripción pueden ser para mejorar, curativos o profilácticos. Los tratamientos pueden ser parte de una inmunoterapia autóloga o parte de una inmunoterapia alogénica. Por autólogo, se entiende que las células, la línea celular o la población de células usadas para tratar pacientes se originan en el paciente o de un donante compatible con el Antígeno Leucocitario Humano (HLA). Por alogénico se entiende que las células, la línea celular o la población de células usadas para tratar pacientes no se originan en el paciente sino en un donante.

Las células que pueden usarse con los métodos descritos se describen en la presente descripción. Los tratamientos pueden usarse para tratar a pacientes diagnosticados con una afección de cáncer premaligno o maligno caracterizada por células que expresan BCMA, específicamente por una sobreabundancia de células que expresan BCMA. Tales afecciones se encuentran en cánceres, tales como el mieloma múltiple.

Los tipos de cánceres que van a tratarse con las células modificadas genéticamente de la invención incluyen, pero no se limitan a, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström, linfoma de Burkitt y linfoma difuso de células B grandes, así como también otros cánceres de células B o de células plasmáticas. En algunas modalidades, las células modificadas genéticamente pueden usarse para tratar una enfermedad o trastorno que expresa BCMA, tal como la enfermedad de Castleman, linfoma linfoplasmocítico, linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma de zona marginal, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin o leucemia linfocítica crónica.

Las composiciones y métodos de la presente invención pueden usarse para tratar a un sujeto que se ha caracterizado por tener células o tejidos que expresan BCMA, o se sospecha que tiene células o tejidos que expresan BCMA. Por ejemplo, los sujetos que se benefician del tratamiento de acuerdo con la invención incluyen sujetos con mieloma múltiple.

La administración de las células o la población de células de acuerdo con la presente invención puede realizarse de cualquier manera conveniente, que incluye inhalación de aerosol, inyección, ingestión, transfusión, implantación o trasplante. Las composiciones descritas en la presente descripción pueden administrarse a un paciente por vía subcutánea, intradérmica, intratumoral, intraganglionar, intramedular, intramuscular, por inyección intravenosa o intralinfática o intraperitoneal. En una modalidad, las composiciones celulares de la presente invención se administran, preferentemente, mediante inyección intravenosa.

La administración de las células o población de células puede consistir en la administración de 10^4 - 10^9 células por kg de peso corporal, preferentemente, de 10^5 a 10^6 células/kg de peso corporal que incluye todos los valores enteros de los números de células dentro de esos intervalos. Las células o la población de células pueden administrarse en una o más dosis. En algunas modalidades, la cantidad eficaz de células se administra como una dosis única. En algunas modalidades, la cantidad eficaz de células se administra como más de una dosis durante un período de tiempo. El momento de la administración está a criterio del médico responsable y depende de la afección clínica del paciente. Las células o la población de células pueden obtenerse de cualquier fuente, tal como un banco de sangre o un donante. Aunque las necesidades individuales varían, la determinación de los intervalos de cantidades eficaces de un tipo de célula dado para una enfermedad o afección particular está dentro del conocimiento de la técnica. Una cantidad eficaz significa una cantidad que proporciona un beneficio terapéutico o profiláctico. La dosificación 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 una modalidad, la cantidad eficaz de células o composición que comprende esas células se administra por vía parenteral. Esta administración puede ser una administración intravenosa. En algunos casos, la administración puede realizarse directamente mediante inyección dentro de un tumor.

En determinadas modalidades de la presente invención, las células se administran a un paciente junto con (por ejemplo, antes, simultáneamente o después) cualquier número de modalidades de tratamiento relevantes, que incluyen pero no se limitan al tratamiento con agentes tales como terapia antiviral, cidofovir e interleucina-2, Citarabina (también conocida como ARA-C) o tratamiento con natalizumab para pacientes con MS o tratamiento con efalizumab para pacientes con psoriasis u otros tratamientos para pacientes con PML. En modalidades adicionales, las células T de la invención pueden usarse en combinación con quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos u otros agentes inmunoablativos tales como CAMPATH, anticuerpos anti-CD3 u otras terapias con anticuerpos, citoxina, fludaribina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228, citocinas e irradiación.

En una modalidad adicional, las composiciones de células de la presente invención se administran a un paciente junto con (por ejemplo, antes, simultáneamente o después) de un trasplante de médula ósea, terapia ablativa de células T mediante el uso de agentes de quimioterapia tales como fludarabina, terapia de radiación de haz externo (XRT), ciclofosfamida, o anticuerpos tales como OKT3 o CAMPATH. En otra modalidad, las composiciones de células de la presente invención se administran después de una terapia ablativa de células B tales como agentes que reaccionan con CD20, por ejemplo, Rituxan. Por ejemplo, en una modalidad, los sujetos pueden someterse a un tratamiento estándar con quimioterapia de dosis alta seguida de un trasplante de células madre de sangre periférica. En determinadas modalidades, después del trasplante, los sujetos reciben una infusión de las células inmunitarias expandidas de la presente invención. En una modalidad adicional, las células expandidas se administran antes o después de la cirugía. En determinadas modalidades, puede usarse cualquier medio (por ejemplo, cirugía, quimioterapia o radioterapia) para reducir la carga tumoral antes de la administración de las células inmunitarias expandidas de la invención. En una modalidad, la reducción de la carga

tumoral antes de la administración de las células modificadas genéticamente de la invención puede reducir el potencial de, o prevenir, el síndrome de liberación de citocinas o una tormenta de citocinas, un efecto secundario que puede estar asociado con la terapia con células T CAR.

Tratamientos Conjuntos

La presente invención proporciona métodos que comprenden la administración de células modificadas genéticamente o una población de células que comprenden cualquiera de los receptores antigénicos quiméricos descritos en la presente descripción en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Los agentes terapéuticos adicionales ilustrativos que pueden combinarse o administrarse en combinación con las células o la población de células de la presente invención incluyen, por ejemplo, un agente antitumoral (por ejemplo, agentes quimioterapéuticos que incluyen melfalán, vincristina (Oncovin), ciclofosfamida (Cytosan), etopósido (VP-16), doxorubicina (Adriamicina), doxorubicina liposomal (Doxil), obendamustina (Treanda), o cualquiera de otros conocidos por ser eficaces en el tratamiento de un tumor de células plasmáticas en un sujeto.). En algunas modalidades, el segundo agente terapéutico comprende esteroides. En algunas modalidades, el segundo agente terapéutico comprende terapias dirigidas que incluyen talidomida, lenalidomida y bortezomib, que son terapias aprobadas para tratar a pacientes recién diagnosticados. Lenalidomida, pomalidomida, bortezomib, carfilzomib, panobinostat, ixazomib, elotuzumab, y daratumumab son ejemplos de un segundo agente terapéutico eficaz para tratar el mieloma recurrente. En determinadas modalidades, el segundo agente terapéutico es un régimen que comprende radioterapia o un trasplante de células madre. En determinadas modalidades, el segundo agente terapéutico puede ser un agente inmunomodulador. En determinadas modalidades, el segundo agente terapéutico puede ser un inhibidor del proteosoma, que incluye bortezomib (Velcade), carfilzomib (Kymprolis), ixazomib (Ninlaro). En determinadas modalidades, el segundo agente terapéutico puede ser un inhibidor de histona desacetilasa tal como el panobinostat (Farydak). En determinadas modalidades, el segundo agente terapéutico puede ser un anticuerpo monoclonal, un conjugado de anticuerpo-fármaco, un anticuerpo biespecífico conjugado con un agente antitumoral, un inhibidor de punto de control o combinaciones de estos. Otros agentes que pueden administrarse beneficiosamente en combinación con las moléculas de unión a antígenos de la invención incluyen inhibidores de citocinas, que incluye los inhibidores de citocinas de molécula pequeña y anticuerpos que se unen a citocinas tales como

IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18 o sus respectivos receptores. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención (por ejemplo, las composiciones farmacéuticas que comprenden células o poblaciones de células modificadas genéticamente como se describe en la presente descripción) pueden administrarse, además, como parte de un régimen terapéutico que comprende una o más combinaciones terapéuticas seleccionadas de un anticuerpo monoclonal distinto de los descritos en la presente descripción, que puede interactuar con un antígeno diferente en la superficie de la célula plasmática, un anticuerpo biespecífico, que tiene un brazo que se une a un antígeno en la superficie de la célula tumoral y el otro brazo se une a un antígeno sobre una célula T, un conjugado de anticuerpo-fármaco, un anticuerpo biespecífico conjugado con un agente antitumoral, un inhibidor de punto de control, por ejemplo, uno que se dirige a PD-1 o CTLA-4, o combinaciones de estos. En determinadas modalidades, los inhibidores de punto de control pueden seleccionarse de inhibidores de PD-1, tales como pembrolizumab (Keytruda), nivolumab (Opdivo) o cemiplimab (REGN2810). En determinadas modalidades, los inhibidores de punto de control pueden seleccionarse de inhibidores de PD-L1, tales como atezolizumab (Tecentriq), avelumab (Bavencio) o Durvalumab (Imfinzi)). En determinadas modalidades, los inhibidores de punto de control pueden seleccionarse de inhibidores de CTLA-4, tal como ipilimumab (Yervoy).

La presente invención incluye, además, combinaciones terapéuticas que comprenden cualquiera de las células o poblaciones de células modificadas genéticamente mencionadas en la presente descripción y un inhibidor de uno o más de VEGF, Ang2, DLL4, EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFRvIII, cMet, IGF1R, B-raf, PDGFR- α , PDGFR- β , FOLH1 (PSMA), PRLR, STEAP1, STEAP2, TMPRSS2, MSLN, CA9, uroplakin, o cualquiera de las citocinas mencionadas anteriormente, en donde el inhibidor es una aptámero, una molécula antisentido, una ribozima, un ARNip, un peptidocuerpo, un nanocuerpo o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, fragmento Fab; fragmento F(ab')₂; fragmento Fd; fragmento Fv; scFv; fragmento dAb; u otras moléculas modificadas genéticamente, tales como diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos y unidades de reconocimiento mínimo). En algunas modalidades, las células o poblaciones de células modificadas genéticamente de la invención pueden administrarse, además, como parte de un régimen de tratamiento que también incluye tratamiento de radiación y/o quimioterapia convencional.

Los componentes activos terapéuticamente adicionales pueden administrarse justo antes de, simultáneamente con, o poco después de la administración de las células

modificadas genéticamente de la presente invención; (para los fines de la presente descripción, tales regímenes de administración se consideran la administración de células modificadas genéticamente "en combinación con" un componente activo terapéuticamente adicional).

La presente invención incluye composiciones farmacéuticas en las que las células o poblaciones celulares modificadas genéticamente de la presente invención se formulan conjuntamente con uno o más de los componentes activos terapéuticamente adicionales, como se describe en otra parte en la presente descripción.

Regímenes de Administración

De acuerdo con determinadas modalidades de la presente invención, pueden administrarse múltiples dosis de las células modificadas genéticamente a un sujeto durante un transcurso de tiempo definido. Los métodos de acuerdo con este aspecto de la invención comprenden administrar de forma secuencial a un sujeto múltiples dosis de las células. Como se usa en la presente descripción, "administración secuencial" significa que cada dosis se administra al sujeto en un momento diferente, por ejemplo, en días diferentes separados por un intervalo predeterminado (por ejemplo, horas, días, semanas o meses). La presente invención incluye métodos que comprenden administrar secuencialmente al paciente una única dosis inicial, seguida de una o más dosis secundarias, y opcionalmente seguida de una o más dosis terciarias.

Los términos "dosis inicial", "dosis secundarias" y "dosis terciarias" se refieren a la secuencia temporal de administración de las células modificadas genéticamente de la invención. Por lo tanto, la "dosis inicial" es la dosis que se administra al comienzo del régimen de tratamiento (también denominada "dosis de referencia"); las "dosis secundarias" son las dosis que se administran después de la dosis inicial; y las "dosis terciarias" son las dosis que se administran después de las dosis secundarias. Las dosis iniciales, secundarias y terciarias pueden contener la misma cantidad de las células modificadas genéticamente, pero en general pueden diferir entre sí en términos de la frecuencia de administración. En determinadas modalidades, sin embargo, la cantidad de las células modificadas genéticamente contenida en la dosis inicial, secundaria y/o terciaria varían entre sí (por ejemplo, aumentan o disminuyen según sea adecuado) durante el período de tratamiento. En determinadas modalidades, se administran dos o más dosis (por ejemplo, 2, 3, 4 o 5) al comienzo del régimen de tratamiento como "dosis de carga", seguidas de dosis posteriores que se administran de manera menos frecuente (por ejemplo, "dosis de mantenimiento").

En una modalidad ilustrativa de la presente invención, se administra cada dosis secundaria y/o terciaria de 1 a 26 (por ejemplo, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½ o más) semanas después de la dosis inmediatamente anterior. La frase "la dosis inmediatamente anterior", como se usa en la presente descripción, significa, en una secuencia de administraciones múltiples, la dosis que se administra a un paciente antes de la administración de la siguiente dosis en la secuencia sin dosis intermedias.

Los métodos de acuerdo con este aspecto de la invención pueden comprender administrar a un paciente cualquier cantidad de dosis secundarias y/o terciarias. Por ejemplo, en determinadas modalidades, solo se administra una dosis secundaria única al paciente. En otras modalidades, se administran al paciente dos o más dosis secundarias (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más). Del mismo modo, en determinadas modalidades, solo se administra una dosis terciaria única al paciente. En otras modalidades, se administran al paciente dos o más dosis terciarias (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más).

En las modalidades que implican múltiples dosis secundarias, cada dosis secundaria puede administrarse a la misma frecuencia que las otras dosis secundarias. Por ejemplo, cada dosis secundaria puede administrarse al paciente 1 a 2 semanas después de la dosis inmediatamente anterior. De manera similar, en modalidades que implican múltiples dosis terciarias, cada dosis terciaria puede administrarse a la misma frecuencia que las otras dosis terciarias. Por ejemplo, cada dosis terciaria puede administrarse al paciente 2 a 4 semanas después de la dosis inmediatamente anterior. De manera alternativa, la frecuencia con la que se administran las dosis secundarias y/o terciarias a un paciente puede variar durante el transcurso del régimen de tratamiento. La frecuencia de la administración puede ajustarse, además, durante el transcurso del tratamiento por un médico, en función de las necesidades del paciente individual después de un examen clínico.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se establecen para proporcionar a los expertos en la técnica un descubrimiento y descripción completas de cómo se realizan y usan los métodos y las composiciones de la invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención. Se ha intentado garantizar la precisión con

respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etcétera), pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura está en grados Centígrados y la presión es o está cerca de la atmosférica.

Ejemplo 1: Generación de Anticuerpos anti-BCMA

Los anticuerpos anti-BCMA se obtuvieron mediante la inmunización de un ratón modificado genéticamente con un antígeno de BCMA humano (por ejemplo, hBCMA, SEQ ID NO: 101), o mediante la inmunización de un ratón modificado genéticamente que comprende ADN que codifica las regiones variables de la cadena pesada y ligera kappa de inmunoglobulina humana con un antígeno BCMA humano.

Después de la inmunización, se recolectaron esplenocitos de cada ratón y (1) se fusionaron con células de mieloma de ratón para preservar su viabilidad y formar células de hibridoma y se cribaron para determinar la especificidad para BCMA, o (2) se clasificaron las células B (como se describe en el documento US 2007/0280945A1) mediante el uso de un fragmento de BCMA humano como reactivo de clasificación que se une e identifica a los anticuerpos reactivos (células B positivas para el antígeno).

Los anticuerpos quiméricos para BCMA se aislaron inicialmente con una región variable humana y una región constante de ratón. Los anticuerpos se caracterizaron y seleccionaron para las características convenientes, que incluyen afinidad, selectividad, etcétera. De ser necesario, las regiones constantes del ratón se sustituyeron con una región constante humana conveniente, por ejemplo, la región constante de IgG1 o IgG4 o de tipo silvestre o modificada, para generar un anticuerpo anti-BCMA completamente humano. Aunque la región constante seleccionada puede variar de acuerdo con el uso específico, las características de unión al antígeno de alta afinidad y especificidad por la diana residen en la región variable.

Secuencias de Aminoácidos y Ácidos Nucleicos de Región Variable de Cadena Pesada y Ligera de anticuerpos anti-BCMA: La Tabla 1 expone los identificadores de secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y ligera y CDR de anticuerpos anti-BCMA seleccionados de la invención. Los correspondientes identificadores de secuencias de ácido nucleico se exponen en la Tabla 2.

Tabla 1: Identificadores de Secuencia de Aminoácidos

	SEQ ID NO:							
Designación de anticuerpos	H CVR	H CDR1	H CDR2	H CDR3	L CVR	L CDR1	L CDR2	L CDR3
AcM16711	2	4	6	8	10	12	14	16
AcM16716	18	20	22	24	26	28	30	32
AcM16732	34	36	38	40	42	44	46	48
AcM16747	50	52	54	56	58	60	62	64
AcM21581	66	68	70	72	74	76	78	80

Tabla 2: Identificadores de Secuencia de Ácidos Nucleicos

	SEQ ID NO:							
Designación de anticuerpos	H CVR	H CDR1	H CDR2	H CDR3	L CVR	L CDR1	L CDR2	L CDR3
AcM16711	1	3	5	7	9	11	13	15
AcM16716	17	19	21	23	25	27	29	31
AcM16732	33	35	37	39	41	43	45	47
AcM16747	49	51	53	55	57	59	61	63
AcM21581	65	67	69	71	73	75	77	79

Ejemplo 2: Generación de Receptores antigénicos Quiméricos Específicos de BCMA

Se reformatearon seis anticuerpos anti-BCMA (AcM16711, AcM16716, AcM16732, AcM16747, y AcM21581) en fragmentos variables de cadena única VL-VH (ScFv) y se colocaron en una construcción de receptor antigénico quimérico (CAR) que usaba una bisagra CD8 α y dominio transmembrana, dominio coestimulador 4-1BB y un dominio estimulador CD3 ζ . Los CAR específicos de BCMA se clonaron en un vector de expresión lentiviral (Lenti-X™ Bicistronic Expression System (Neo), Clontech Cat # 632181) y las partículas lentivirales se generaron mediante el sistema Lenti-X Packaging Single-Shot (VSV-G) (Clontech Cat # 631276) de acuerdo con los protocolos del fabricante. Las células Jurkat modificadas genéticamente para expresar un indicador de NFAT-luciferasa (Jurkat/NFATLuc cl. 3C7) se transdujeron después

con las diferentes construcciones de CAR mediante el uso de placas recubiertas previamente RetroNectin® (Clontech, Cat # T110a) de acuerdo con los protocolos del fabricante. Después de la selección durante al menos 2 semanas en 500 µg/ml G418 (Gibco, Cat # 11811-098), se generaron las siguientes líneas de células T CAR; Jurkat/NFATLuc cl. 3C7/BCMA 16716 VL-VH CART, Jurkat/NFATLuc cl. 3C7/BCMA 16711 VL-VH CART, Jurkat/NFATLuc cl. 3C7/BCMA 16732 VL-VH CART, Jurkat/NFATLuc cl. 3C7/BCMA 16747 VL-VH CART, Jurkat/NFATLuc cl. 3C7/BCMA 21581 VL-VH CART. Las secuencias de nucleótidos de las construcciones CAR usadas en la generación de estas líneas celulares T CAR, como se ilustra en la Figura 1, se muestran en las SEQ ID NO: 81 (AcM16711 VL/VH), 83 (AcM16716 VL/VH), 85 (AcM16732 VL/VH), 87 (AcM16747 VL/VH), y 89 (AcM21581 VL/VH). Estas seis líneas de células T CAR se usaron para evaluar la expresión de la superficie celular y la activación de las células T CAR BCMA, como se discute en el Ejemplo 3.

Los receptores antigénicos quiméricos que contienen un scFv anti-BCMA VL-VH, un dominio transmembrana huCD8, un dominio coestimulador 4-1BB y un dominio de señalización CD3ζ se construyeron mediante el uso de las secuencias de nucleótidos VL y VH de dos anticuerpos anti-BCMA, AcM21581 y AcM16747 (correspondientes a las SEQ ID NO: 89 y 87, respectivamente). Como control de no unión, se diseñó un CAR similar mediante el uso de la secuencia de nucleótidos de un scFv irrelevante (construcción CAR de la SEQ ID NO: 91). Estos CAR se clonaron en un vector lentiviral pLVX con un promotor EF1a y una secuencia IRES:eGFP (para la trazabilidad de las células transducidas con CAR) y se produjo lentivirus pseudotipado de VSV.

Se aislaron células T CD3+ de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC), se estimularon con microperlas CD3/CD28 más 100 U/mL de IL-2 humana recombinante y se transdujeron con el lentivirus a un MOI=5. Las células transducidas se expandieron durante 3 semanas con microperlas CD3/CD28 más 100 U/mL de IL-2 humana recombinante antes de criopreservarse hasta su uso durante el experimento *in vivo*. Estas tres líneas de células T CAR se usaron para evaluar la eficacia en la reducción de la carga tumoral *in vivo*, como se discute en los Ejemplos 4 y 5.

Ejemplo 3: Expresión en la Superficie Celular de Construcciones BCMA CAR en Células Jurkat y Activación de células T CAR BCMA

Se accedió a la expresión relativa en la superficie celular de las construcciones BCMA CAR en células Jurkat/NFATLuc mediante citometría de flujo. Para teñir, las células se sembraron en tampón de tinción (PBS, sin calcio y magnesio (Irving 9240) + FBS al 2

% (ATCC 30-2020) a una densidad de 200,000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo en V y se tiñeron durante 30 minutos a 4°C con 10 ug/mL del dominio extracelular BCMA fusionado con un hlgG1-Fc (BCMA ecto-hFc) o una proteína irrelevante fusionada con hlgG1-Fc (control de isotipo Fc). Después de la incubación con BCMA-hFc o control de isotipo Fc, las células se lavaron una vez en tampón de tinción y se tiñeron con un anticuerpo secundario conjugado Alexa-Flúor 647 (Jackson ImmunoResearch, Cat # 109-606-170) a 10µg/mL durante 30 minutos a 4°C. Después, las células se lavaron y fijaron mediante el uso de una solución al 50 % de BD Cytofix (BD, Cat # 554655) diluida en tampón de tinción. Las muestras se procesaron en el citómetro de flujo Intellicyt iQue y se analizaron con FlowJo 10.2 para calcular la intensidad fluorescente media (MFI). La relación señal/ruido (S:N) se determinó tomando la relación de la MFI de BCMA-hFc o control de isotipo Fc con respecto a la MFI del anticuerpo secundario solo.

La actividad de las líneas T CAR se evaluó en un bioensayo CAR-T/APC (célula presentadora de antígeno). Para realizar el bioensayo, se agregaron 50,000 células T CAR a placas blancas de 96 pocillos Thermo-Nunc (Thermo Scientific, Cat # 136101) en 50 ul de medio de ensayo (medio RPMI con 10 % de FBS y 1 % P/S/G) seguido de la adición de una dilución en serie de 3 veces de APC (500,000 células a 685 células) en 50 ul de medio de ensayo. Se utilizaron las siguientes APC: RAJI, Daudi, RPMI8226 (que expresan de forma endógena BCMA) y HEK293 (BCMA negativo). La mezcla de células se incubó en una incubadora humidificada a 37°C, 5 % de CO₂, durante 5 horas. La actividad de NFAT-Luciferasa se midió mediante el uso de Promega One-Glo (Cat # E6130) y un lector de placas Perkin Elmer Envision. Se generaron unidades de luciferasa relativas (RLU) y se representaron gráficamente en GraphPad Prism mediante el uso de una ecuación logística de cuatro parámetros sobre una curva de respuesta de 8 puntos. La condición de cero APC para cada curva dosis-respuesta también se incluye en el análisis como una continuación de la dilución en serie de tres veces y se representó como la dosis más baja. La actividad CAR-T se determinó tomando la relación entre las RLU más alta en la curva y la más baja y se representa como señal:ruido (S:N) en la Tabla 4.

La Tabla 3 muestra que las CAR-T 16747 y 21581 tenían una expresión de superficie similar con el S: N que variaba de 209-273, las T CAR 16716 expresaron 44 veces por encima del fondo, mientras que la expresión de las CAR 16732 y 16711 era mucho menor con un S:N de 13 y 4, respectivamente.

La Tabla 4 muestra que las seis líneas celulares T CAR BCMA se activaron por células RAJI, Daudi y RPMI8226. Las líneas de células T CAR no se activaron por HEK293. La CAR 16747 BCMA tuvo la activación más fuerte en el bioensayo CAR-T/APC mientras que CAR 16711 tuvo la actividad más débil independientemente de la APC que expresa BCMA. Por último, se observó una correlación entre la expresión de CAR (Tabla 3) y la actividad de CAR (Tabla 4).

Tabla 3: Unión de FC-BCMA Soluble en Líneas Celulares T CAR BCMA

Línea celular	S:N (BCMA-hFc)	S:N (Isotipo-hFc)
Jurkat/NFATLuc cl, 3C7	1,5	0,8
Jurkat/NFATLuc cl, 3C7/ 16716 VL-VH CART	44,0	1,1
Jurkat/NFATLuc cl, 3C7/ 16711 VL-VH CART	3,7	1,2
Jurkat/NFATLuc cl, 3C7/ 16732 VL-VH CART	13,1	1,0
Jurkat/NFATLuc cl, 3C7/ 16747 VL-VH CART	209,2	1,3
Jurkat/NFATLuc cl, 3C7/ 21581 VL-VH CART	224,5	1,2

Tabla 4: Activación de las T CAR de BCMA en un Bioensayo CAR-T/APC

Célula Presentadora de Antígeno	Actividad Max CAR-T					
	No CAR	16716	16711	16732	16747	21581
RAJI	1,2	16,3	7,9	16,8	38,9	26,9
Daudi	1,0	6,4	2,6	4,9	14,0	8,0
RPMI8226	0,8	6,6	1,8	5,2	12,5	12,3
HEK293	0,9	0,8	0,9	0,8	0,9	0,9

Ejemplo 4: Las células T CAR dirigidas a BCMA Reducen el Crecimiento de Tumores que Expresan BCMA (OPM-2) In Vivo en un Modelo de Tumor Xenogénico

Para determinar la eficacia in vivo de las células T del receptor antigénico quimérico (CAR) dirigidas a BCMA, se realizó un estudio de tumores xenogénicos en ratones mediante el uso de células de mieloma múltiple humano OPM-2, que expresan altos niveles de BCMA.

Implantación y medición de los tumores xenogénicos: En el día 0, los ratones inmunodeficiente NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) se les administró por vía

intravenosa 2×10^6 células tumorales de mieloma múltiple BCMA⁺ OPM-2 que se modificaron genéticamente para expresar también luciferasa de luciérnaga (células OPM-2-luciferasa). En el día 21, los ratones se inyectaron por vía intravenosa con 2×10^6 células T que expresan o bien el control de CAR o un CAR anti-BCMA (como se determina por la frecuencia de células que expresan GFP, que es un marcador para aquellas células que se transdujeron con CAR). Los ratones (n=5 por grupo) se les administró 2×10^6 T CAR scFc irrelevante (control scFv CAR), 2×10^6 T CAR anti-BCMA que codifica la scFv 21581 CAR, o 2×10^6 T CAR anti-BCMA que codifica la scFv 16747. El crecimiento del tumor se evaluó hasta el día 61 mediante la medición de la bioluminiscencia del tumor (BLI) en animales anestesiados. Como un control positivo, a un grupo de ratones (n=5) se les administraron solo células OPM-2-luciferasa, pero no células T. Para medir los niveles de BLI de fondo, un grupo de ratones (n=5) no se trató y no recibió tumores ni células T.

Medición del crecimiento tumoral xenogénico: se usaron imágenes BLI para medir la carga tumoral. A los ratones se les inyectó IP 150 mg/kg del sustrato de luciferasa D-luciferina suspendido en PBS. Cinco minutos después de esta inyección, las imágenes de BLI de los ratones se realizaron bajo anestesia de isoflurano mediante el uso del sistema Xenogen IVIS. La adquisición de imágenes se realizó con el campo de visión a D, altura del sujeto de 1,5 cm y nivel de agrupamiento medio con tiempo de exposición automático determinado por el programa informático Living Image. Las señales BLI se extrajeron mediante el uso del programa informático Living Image: se dibujaron las regiones de interés alrededor de cada masa tumoral y las intensidades de los fotones se registraron como p/s/cm²/sr.

Mientras que los tumores BCMA⁺ OPM-2-luciferasa crecían progresivamente en ratones que recibían células T CAR scFv irrelevantes, las células T CAR que codifican el CAR scFv 21581 redujeron la carga tumoral a niveles de fondo en la mayoría de los animales y las células T CAR que codifican el CAR SCFv 16747 redujeron cargas tumorales a niveles de fondo en todos los animales. Los resultados se muestran en la Tabla 5a, más abajo.

Tabla 5a: Tamaño Medio del Tumor (por luminiscencia) en Varios Momentos

T CAR Tratamiento	Luminiscencia [p/s/cm²/sr] 5 días después de la implantación (media ± SEM)
Sin tumor (fondo BLI)	6,22E+05 ± 2,77E+04
Sin T CAR (control positivo)	5,62E+05 ± 2,75E+04
Células T CAR Control (scFv irrelevante) 2x10 ⁶	5,95E+05 ± 2,40E+04
Células CAR anti-BCMA (21581 scFv) 2x10 ⁶	6,07E+05 ± 3,97E+04
Células CAR anti-BCMA (16747 scFv) 2x10 ⁶	5,54E+05 ± 2,80E+04

T CAR Tratamiento	Luminiscencia [p/s/cm²/sr] 11 días después de la implantación (media ± SEM)
Sin tumor (fondo BLI)	6,90E+05 ± 3,64E+04
Sin T CAR (control positivo)	6,22E+05 ± 3,34E+04
Células T CAR Control (scFv irrelevante) 2x10 ⁶	6,80E+05 ± 2,76E+04
Células CAR anti-BCMA (21581 scFv) 2x10 ⁶	7,13E+05 ± 2,90E+04
Células CAR anti-BCMA (16747 scFv) 2x10 ⁶	6,30E+05 ± 2,42E+04

T CAR Tratamiento	Luminiscencia [p/s/cm²/sr] 20 días después de la implantación (media ± SEM)
Sin tumor (fondo BLI)	7,59E+05 ± 5,82E+04
Sin T CAR (control positivo)	2,32E+06 ± 2,94E+05
Células T CAR Control (scFv irrelevante) 2x10 ⁶	2,80E+06 ± 5,26E+05
Células CAR anti-BCMA (21581 scFv) 2x10 ⁶	3,06E+06 ± 4,42E+05
Células CAR anti-BCMA (16747 scFv) 2x10 ⁶	2,53E+06 ± 2,22E+05

T CAR Tratamiento	Luminiscencia [p/s/cm²/sr] 26 días después de la implantación (media ± SEM)
Sin tumor (fondo BLI)	5,51E+05 ± 2,51E+04
Sin T CAR (control positivo)	5,96E+06 ± 8,74E+05
Células T CAR Control (scFv irrelevante) 2x10 ⁶	8,03E+06 ± 1,41E+06
Células CAR anti-BCMA (21581 scFv) 2x10 ⁶	6,76E+06 ± 1,34E+06
Células CAR anti-BCMA (16747 scFv) 2x10 ⁶	6,96E+06 ± 3,39E+05

T CAR Tratamiento	Luminiscencia [p/s/cm²/sr] 31 días después de la implantación (media ± SEM)
Sin tumor (fondo BLI)	6,62E+05 ± 3,35E+04
Sin T CAR (control positivo)	1,58E+07 ± 4,84E+06
Células T CAR Control (scFv irrelevante) 2x10 ⁶	1,57E+07 ± 3,05E+06
Células CAR anti-BCMA (21581 scFv) 2x10 ⁶	1,44E+07 ± 2,12E+06
Células CAR anti-BCMA (16747 scFv) 2x10 ⁶	1,01E+07 ± 5,46E+05

T CAR Tratamiento	Luminiscencia [p/s/cm²/sr] 34 días después de la implantación (media ± SEM)
Sin tumor (fondo BLI)	4,57E+05 ± 1,04E+04
Sin T CAR (control positivo)	3,36E+07 ± 1,27E+07
Células T CAR Control (scFv irrelevante) 2x10 ⁶	3,00E+07 ± 2,82E+06
Células CAR anti-BCMA (21581 scFv) 2x10 ⁶	2,05E+07 ± 3,56E+06
Células CAR anti-BCMA (16747 scFv) 2x10 ⁶	8,31E+06 ± 9,79E+05

T CAR Tratamiento	Luminiscencia [p/s/cm²/sr] 38 días después de la implantación (media ± SEM)
Sin tumor (fondo BLI)	6,60E+05 ± 3,13E+04
Sin T CAR (control positivo)	3,91E+07 ± 6,87E+06
Células T CAR Control (scFv irrelevante) 2x10 ⁶	4,25E+07 ± 5,08E+06
Células CAR anti-BCMA (21581 scFv) 2x10 ⁶	2,19E+07 ± 7,88E+06
Células CAR anti-BCMA (16747 scFv) 2x10 ⁶	1,90E+06 ± 1,20E+06

T CAR Tratamiento	Luminiscencia [p/s/cm²/sr] 40 días después de la implantación (media ± SEM)
Sin tumor (fondo BLI)	5,39E+05 ± 9,67E+03
Sin T CAR (control positivo)	Animales sacrificados
Células T CAR Control (scFv irrelevante) 2x10 ⁶	Animales sacrificados
Células CAR anti-BCMA (21581 scFv) 2x10 ⁶	1,13E+07 ± 4,84E+06
Células CAR anti-BCMA (16747 scFv) 2x10 ⁶	8,71E+05 ± 2,80E+05

T CAR Tratamiento	Luminiscencia [p/s/cm²/sr] 47 días después de la implantación (media ± SEM)
Sin tumor (fondo BLI)	7,73E+05 ± 1,91E+04
Sin T CAR (control positivo)	Animales sacrificados
Células T CAR Control (scFv irrelevante) 2x10 ⁶	Animales sacrificados
Células CAR anti-BCMA (21581 scFv) 2x10 ⁶	3,17E+07 ± 3,11E+07
Células CAR anti-BCMA (16747 scFv) 2x10 ⁶	8,85E+05 ± 3,72E+04

T CAR Tratamiento	Luminiscencia [p/s/cm²/sr] 54 días después de la implantación (media ± SEM)
Sin tumor (fondo BLI)	7,49E+05 ± 1,95E+04
Sin T CAR (control positivo)	Animales sacrificados
Células T CAR Control (scFv irrelevante) 2x10 ⁶	Animales sacrificados
Células CAR anti-BCMA (21581 scFv) 2x10 ⁶	4,34E+07 ± 4,29E+07
Células CAR anti-BCMA (16747 scFv) 2x10 ⁶	8,24E+05 ± 5,48E+04

T CAR Tratamiento	Luminiscencia [p/s/cm²/sr] 61 días después de la implantación (media ± SEM)
Sin tumor (fondo BLI)	6,18E+05 ± 2,77E+04
Sin T CAR (control positivo)	Animales sacrificados
Células T CAR Control (scFv irrelevante) 2x10 ⁶	Animales sacrificados
Células CAR anti-BCMA (21581 scFv) 2x10 ⁶	6,41E+05 ± 4,07E+04
Células CAR anti-BCMA (16747 scFv) 2x10 ⁶	5,40E+05 ± 2,93E+04

Se realizó un experimento adicional como se discutió anteriormente, excepto que los ratones se inyectaron por vía intravenosa con 2x10⁶ células T que expresan o bien el control de CAR o un CAR anti-BCMA en el día 22 (en vez de día 21), y el crecimiento del tumor se evaluó hasta el día 56 (en vez del día 61).

Mientras que los tumores BCMA⁺ OPM-2-luciferasa crecieron progresivamente en ratones que recibieron células T CAR scFv irrelevantes, las células T CAR que codifican los CAR scFV 21581 y 16747 redujeron la carga tumoral a niveles de fondo en todos los animales. Los resultados se muestran en la Tabla 5b, más abajo.

Tabla 5b: Tamaño Promedio del Tumor (por luminiscencia) en Varios Momentos

T CAR Tratamiento	Luminiscencia [p/s/cm²/sr] 14 días después de la implantación (media ± SEM)
Sin tumor (fondo BLI)	6,72E+05 ± 1,50E+04
Sin T CAR (control positivo)	7,93E+05 ± 8,18E+04
Células T CAR Control (scFv irrelevante) 2x10 ⁶	7,09E+05 ± 2,13E+04
Células CAR anti-BCMA (21581 scFv) 2x10 ⁶	7,87E+05 ± 1,20E+05
Células CAR anti-BCMA (16747 scFv) 2x10 ⁶	8,93E+05 ± 9,05E+04

T CAR Tratamiento	Luminiscencia [p/s/cm²/sr] 20 días después de la implantación (media ± SEM)
Sin tumor (fondo BLI)	5,32E+05 ± 3,64E+04
Sin T CAR (control positivo)	3,07E+06 ± 3,01E+05
Células T CAR Control (scFv irrelevante) 2x10 ⁶	2,91E+06 ± 2,46E+05
Células CAR anti-BCMA (21581 scFv) 2x10 ⁶	2,57E+06 ± 8,27E+05
Células CAR anti-BCMA (16747 scFv) 2x10 ⁶	3,13E+06 ± 5,97E+05

T CAR Tratamiento	Luminiscencia [p/s/cm²/sr] 23 días después de la implantación (media ± SEM)
Sin tumor (fondo BLI)	5,56E+05 ± 4,29E+04
Sin T CAR (control positivo)	1,01E+07 ± 1,28E+06
Células T CAR Control (scFv irrelevante) 2x10 ⁶	8,37E+06 ± 1,38E+06
Células CAR anti-BCMA (21581 scFv) 2x10 ⁶	1,00E+07 ± 3,92E+06
Células CAR anti-BCMA (16747 scFv) 2x10 ⁶	8,26E+06 ± 1,59E+06

T CAR Tratamiento	Luminiscencia [p/s/cm²/sr] 27 días después de la implantación (media ± SEM)
Sin tumor (fondo BLI)	5,18E+05 ± 2,87E+04
Sin T CAR (control positivo)	1,67E+07 ± 1,54E+06
Células T CAR Control (scFv irrelevante) 2x10 ⁶	1,47E+07 ± 2,36E+06
Células CAR anti-BCMA (21581 scFv) 2x10 ⁶	1,59E+07 ± 6,36E+06
Células CAR anti-BCMA (16747 scFv) 2x10 ⁶	1,03E+07 ± 1,71E+06

T CAR Tratamiento	Luminiscencia [p/s/cm²/sr] 30 días después de la implantación (media ± SEM)
Sin tumor (fondo BLI)	5,18E+05 ± 1,29E+04
Sin T CAR (control positivo)	1,93E+07 ± 3,10E+06
Células T CAR Control (scFv irrelevante) 2x10 ⁶	2,03E+07 ± 2,48E+06
Células CAR anti-BCMA (21581 scFv) 2x10 ⁶	7,21E+06 ± 1,97E+06
Células CAR anti-BCMA (16747 scFv) 2x10 ⁶	1,16E+07 ± 3,61E+06

T CAR Tratamiento	Luminiscencia [p/s/cm²/sr] 34 días después de la implantación (media ± SEM)
Sin tumor (fondo BLI)	5,66E+05 ± 3,76E+04
Sin T CAR (control positivo)	3,69E+07 ± 6,27E+06
Células T CAR Control (scFv irrelevante) 2x10 ⁶	4,07E+07 ± 4,13E+06
Células CAR anti-BCMA (21581 scFv) 2x10 ⁶	5,74E+05 ± 1,24E+04
Células CAR anti-BCMA (16747 scFv) 2x10 ⁶	1,66E+06 ± 9,09E+05

T CAR Tratamiento	Luminiscencia [p/s/cm²/sr] 38 días después de la implantación (media ± SEM)
Sin tumor (fondo BLI)	5,43E+05 ± 3,32E+04
Sin T CAR (control positivo)	Animales sacrificados
Células T CAR Control (scFv irrelevante) 2x10 ⁶	5,87E+07 ± 5,72E+06
Células CAR anti-BCMA (21581 scFv) 2x10 ⁶	5,39E+05 ± 1,58E+04
Células CAR anti-BCMA (16747 scFv) 2x10 ⁶	5,55E+05 ± 5,02E+04

T CAR Tratamiento	Luminiscencia [p/s/cm²/sr] 44 días después de la implantación (media ± SEM)
Sin tumor (fondo BLI)	6,42E+05 ± 3,33E+04
Sin T CAR (control positivo)	Animales sacrificados
Células T CAR Control (scFv irrelevante) 2x10 ⁶	Animales sacrificados
Células CAR anti-BCMA (21581 scFv) 2x10 ⁶	6,68E+05 ± 3,09E+04
Células CAR anti-BCMA (16747 scFv) 2x10 ⁶	5,39E+05 ± 2,25E+04

T CAR Tratamiento	Luminiscencia [p/s/cm²/sr] 56 días después de la implantación (media ± SEM)
Sin tumor (fondo BLI)	8,10E+05 ± 5,92E+04
Sin T CAR (control positivo)	Animales sacrificados
Células T CAR Control (scFv irrelevante) 2x10 ⁶	Animales sacrificados
Células CAR anti-BCMA (21581 scFv) 2x10 ⁶	6,37E+05 ± 2,71E+04
Células CAR anti-BCMA (16747 scFv) 2x10 ⁶	7,13E+05 ± 4,17E+04

Ejemplo 5: Las Células CAR-T Dirigidas a BCMA Reducen el Crecimiento de Tumores que Expresan BCMA (MOLP-8) In Vivo en un Modelo de Tumor Xenogénico

Para determinar la eficacia in vivo de las células T receptor antigénico quimérico (CAR) dirigidas a BCMA, se realizó un estudio de tumores xenogénicos en ratones

mediante el uso de células de mieloma múltiple humano MOLP-8, que expresan niveles bajos de BCMA.

Implantación y medición de los tumores xenogénicos: En el día 0, a los ratones inmunodeficiente NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) se les administró por vía intravenosa 2×10^6 células tumorales de mieloma múltiple humano BCMA⁺ MOLP-8 que se modificaron genéticamente para expresar, además, luciferasa de luciérnaga (células MOLP-8-luciferasa). En el día 12, los ratones se inyectaron por vía intravenosa con 2×10^6 células T que expresan o bien el CAR control o un CAR anti-BCMA (como se determina mediante la frecuencia de células que expresan GFP, que es un marcador para aquellas células que se transdujeron con CAR). Los ratones (n=5 por grupo) se les administró 2×10^6 T CAR scFv irrelevante (control scFv CAR), 2×10^6 T CAR anti-BCMA que codifica la scFv 21581 CAR, o 2×10^6 T CAR anti-BCMA que codifica la scFv 16747. Se evaluó el crecimiento del tumor a lo largo del experimento mediante la medición de la bioluminiscencia del tumor (BLI) en animales anestesiados. Como un control positivo, a un grupo de ratones (n=5) se les administraron solo células MOLP-8-luciferasa, pero no células T. Para medir los niveles de BLI de fondo, un grupo de ratones (n=5) no se trató y no recibió tumores ni células T.

Medición del crecimiento tumoral xenogénico: se usaron imágenes de BLI para medir la carga tumoral. A los ratones se les inyectó IP 150 mg/kg del sustrato de luciferasa D-luciferina suspendido en PBS. Cinco minutos después de esta inyección, las imágenes de BLI de los ratones se realizaron bajo anestesia de isoflurano mediante el uso del sistema Xenogen IVIS. La adquisición de imágenes se realizó con el campo de visión a D, altura del sujeto de 1,5 cm y nivel de agrupamiento medio con tiempo de exposición automático determinado por el programa informático Living Image. Las señales BLI se extrajeron mediante el uso del programa informático Living Image: se dibujaron las regiones de interés alrededor de cada masa tumoral y las intensidades de los fotones se registraron como p/s/cm²/sr.

Mientras que los tumores BCMA⁺ MOLP-8-luciferasa crecieron progresivamente en ratones que recibieron células T CAR scFv irrelevantes, las células T CAR que codifican el CAR scFV 21581 y el CAR scFv 16747 redujeron las cargas tumorales a niveles de fondo en todos los animales. Los resultados se muestran en la Tabla 6, más abajo.

Tabla 6: Tamaño Medio del Tumor (por luminiscencia) en Varios Momentos

T CAR Tratamiento	Luminiscencia [p/s/cm²/sr] 12 días después de la implantación (media ± SEM)
Sin tumor (fondo BLI)	6,81E+05 ± 3,46E+04
Sin T CAR (control positivo)	1,51E+06 ± 7,81E+04
Células T CAR Control (scFv irrelevante) 2x10 ⁶	1,72E+06 ± 1,33E+05
Células CAR anti-BCMA (21581 scFv) 2x10 ⁶	1,46E+06 ± 1,01E+05
Células CAR anti-BCMA (16747 scFv) 2x10 ⁶	1,32E+06 ± 5,86E+04

T CAR Tratamiento	Luminiscencia [p/s/cm²/sr] 18 días después de la implantación (media ± SEM)
Sin tumor (fondo BLI)	7,61E+05 ± 2,73E+04
Sin T CAR (control positivo)	2,01E+07 ± 8,14E+05
Células T CAR Control (scFv irrelevante) 2x10 ⁶	2,11E+07 ± 3,02E+06
Células CAR anti-BCMA (21581 scFv) 2x10 ⁶	5,37E+06 ± 9,01E+05
Células CAR anti-BCMA (16747 scFv) 2x10 ⁶	6,98E+06 ± 9,57E+05

T CAR Tratamiento	Luminiscencia [p/s/cm²/sr] 25 días después de la implantación (media ± SEM)
Sin tumor (fondo BLI)	7,20E+05 ± 2,31E+04
Sin T CAR (control positivo)	5,93E+07 ± 7,71E+06
Células T CAR Control (scFv irrelevante) 2x10 ⁶	6,40E+07 ± 1,71E+07
Células CAR anti-BCMA (21581 scFv) 2x10 ⁶	7,50E+05 ± 4,63E+04
Células CAR anti-BCMA (16747 scFv) 2x10 ⁶	6,77E+05 ± 7,41E+04

T CAR Tratamiento	Luminiscencia [p/s/cm²/sr] 32 días después de la implantación (media ± SEM)
Sin tumor (fondo BLI)	6,85E+05 ± 3,99E+04
Sin T CAR (control positivo)	Animales sacrificados
Células T CAR Control (scFv irrelevante) 2x10 ⁶	Animales sacrificados
Células CAR anti-BCMA (21581 scFv) 2x10 ⁶	6,28E+05 ± 3,75E+04
Células CAR anti-BCMA (16747 scFv) 2x10 ⁶	6,82E+05 ± 2,35E+04

Ejemplo 6: Las Células T CAR Específicas de BCMA Median la Citólisis de Células que Expresan BCMA

Se aislaron células T CD3+ a partir de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC), se estimularon con microperlas CD3/CD28 más 100 U/mL de IL-2 humana recombinante y se transdujeron con el lentivirus a una MOI=5, como se discutió anteriormente en el Ejemplo 2. Las células transducidas se expandieron durante 3 semanas con microperlas CD3/CD28 más 100 U/mL de IL-2 humana recombinante antes de establecer un ensayo citolítico.

Para determinar la capacidad citolítica de las células T receptor antigénico quimérico (CAR) dirigidas a BCMA, se realizó un ensayo citolítico mediante el uso de células T CAR expandidas y varias líneas de células tumorales diana que expresan niveles variables de BCMA. En el día 21 de expansión, las células T CAR expandidas se cultivaron conjuntamente por triplicado en diversas proporciones con líneas celulares diana BCMA+ marcadas con calceína. Cada línea de células diana se cosechó y se suspendió a una densidad de 2x10⁶/mL antes de añadir colorante de calceína-AM a una concentración de 8 uM durante 35 minutos a 37 °C. Después del marcaje con calceína, las células diana se lavaron dos veces para eliminar el exceso de calceína. Posteriormente, las células T y las células diana se cultivaron conjuntamente en una placa de 96 pocillos de fondo redondo en diversas relaciones y se cultivaron a 37 °C durante 2,5 horas cuando se recolectó el sobrenadante del cultivo. Para un control negativo, las células diana se cultivaron conjuntamente con células T generadas mediante el uso de un CAR similar diseñado para contener un scFv irrelevante que no reconoce BCMA. Como un control negativo CAR adicional, se usaron células T

expandidas y no transducidas del mismo donante sano normal. Como un control de la destrucción mediada por células T CAR específicas de antígeno, la línea celular diana K562 de Leucemia Mielógena Crónica se usó, porque esta línea celular es negativa para la expresión de BCMA. Para determinar si la calceína se libera espontáneamente de las líneas celulares diana H-929 y MOLP-8, cada línea celular se cultivó en ausencia de células T CAR. Para determinar la máxima liberación posible de calceína, las líneas celulares diana se cultivaron y se lisaron mediante el uso de medio Optimizer que se complementó para contener un 1 % de detergente Triton™ X-114. Dentro del sobrenadante, los niveles relativos de calceína se midieron mediante el uso de un lector de placas Viktor X4 y el porcentaje de citotoxicidad se calculó como $((\text{señal de calceína} - \text{liberación espontánea de calceína}) / (\text{liberación máxima de calceína} - \text{liberación espontánea de calceína})) * 100$.

Como se muestra en las Tablas 7A-7C, más abajo, los cultivos que consisten en células T CAR+ dirigidas a BCMA generadas mediante el uso de scFv 21581 y 16747 indujeron una citólisis robusta de las células diana H-929 y de las células diana MOLP-8. En relación con las células H-929, se observó un nivel más bajo de citotoxicidad contra las células MOLP8. Este resultado se explica porque H-929 expresa niveles más altos del antígeno BCMA que las células MOLP-8. Para cada cultivo de células T CAR dirigidas a BCMA, se observó el mayor grado de citotoxicidad contra las células H-929, y las células CAR-T dirigidas a BCMA modificadas genéticamente con el scFv 16747 produjeron la mayor magnitud de citotoxicidad contra ambas líneas celulares diana. Tanto las células T no transducidas y expandidas (MOI 0) como las células T CAR irrelevantes (17363), cuando se cultivaron conjuntamente con células diana en la relación máxima de 50 células T por una célula diana, no lograron obtener ninguna citólisis de las células diana MOLP-8 y H-929. Este resultado ilustra que la citólisis sólo se observa cuando la estructura CAR contiene la scFv que reconoce BCMA (por ejemplo, de los AcM21581 y AcM16747). Además, las células T CAR dirigidas a BCMA demostraron una citotoxicidad insignificante contra las células K562 que carecen de expresión de BCMA, lo que indica que la expresión de BCMA es necesaria para que se observe la citólisis.

Tabla 7A: Citólisis mediada por Células T CAR Dirigidas a BCMA

	Célula T CAR / Célula diana							
Relación Efecto T:	21581 / MOLP8		21581 / H929		16747 / MOLP8		16747 / H929	
Células diana	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD
50	9,1	2,0	22,3	0,7	14,0	1,5	29,3	1,8
25	3,7	0,8	10,0	0,9	10,9	2,0	19,4	3,4
12,5	1,6	0,6	3,9	1,4	8,2	0,9	9,3	3,2
6,25	0,6	0,5	1,7	0,7	5,8	1,3	4,2	2,6
3,13	-1,5	0,3	0,0	1,1	2,2	0,9	2,9	2,4
1,56	0,3	0,5	-0,9	2,4	0,2	0,7	1,8	2,3
0,78	-1,3	2,2	-0,7	0,5	-2,9	0,5	0,9	1,7

SD: desviación estándar

Tabla 7B: Citólisis mediada por células T CAR dirigidas a BCMA

	Célula T CAR / Célula diana							
Relación Efecto T:	17363 HPV16 / MOLP8		17363 HPV16 / H929		21581 / K562		16747 / K562	
Células diana	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD
50	-3,1	1,7	-0,8	1,2	2,0	1,1	3,5	1,4

SD: desviación estándar

Tabla 7C: Citólisis mediada por células T CAR dirigida a BCMA

	Célula T CAR / Célula diana			
Relación Efecto T:	Células T CAR Neg / MOLP8		Células T CAR Neg / H929	
Células diana	media	SD	media	SD
50	-1,4	2,0	-0,5	1,5

SD: desviación estándar

Ejemplo 7: Citotoxicidad Ex Vivo mediada por Células T CAR Dirigidas a BCMA en Médula Ósea Derivada de paciente con Mieloma Múltiple

Se aislaron células T CD3+ a partir de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC), se estimularon con microperlas CD3/CD28 más 100 U/mL de IL-2 humana recombinante y se transdujeron con el lentivirus a una MOI=5, como se discutió anteriormente en el Ejemplo 2. Las células transducidas se expandieron durante 3 semanas con microperlas CD3/CD28 más 100 U/ml de IL-2 humana recombinante antes de establecer un ensayo de citotoxicidad.

En la cosecha, las células T CAR en expansión se lavaron y se suspendieron en medio completo (RPMI suplementado con FBS al 10 %, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL y L-glutamina 292 µg/mL). La médula ósea de pacientes con mieloma múltiple se descongeló y se suspendió en medio completo. Se sembraron células estromales HS-5 en placas de 96 pocillos de fondo plano a 10,000 células por pocillo y se incubaron durante la noche. Se añadieron células T y médula ósea derivada del paciente a los pocillos que contenían células estromales en diversas relaciones E:T (titulaciones de 2 veces comenzando en E:T=10:1) y se cultivaron a 37 °C durante 12 horas. Como un control CAR negativo, se usaron células T expandidas y no transducidas del mismo donante sano normal.

Después de 12 horas, se determinó la supervivencia de los blastos de mieloma múltiple mediante el uso de citometría de flujo. Las células se tiñeron con un coctel de anticuerpos conjugados con fluoróforo (anti-CD4, anti-CD8, anti-CD16, anti-CD45, anti-CD90, anti-CD138 y anti-SlamF7) en tampón de tinción BD Horizon Brilliant durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron una vez en PBS y se tiñeron con Tinción de Células Muertas Fijables VIVO/MUERTO durante 20-30 minutos a 4 °C seguido de dos lavados en PBS y se suspendieron en tampón Miltenyi AutoMacs frío. A las muestras se añadieron perlas CountBright para cuantificar el recuento absoluto de células por pocillo. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo BD FortessaX20. Los blastos de mieloma múltiple supervivientes se seleccionaron del portal como CD4-/CD8-/SlamF7+/CD138+ únicos vivos. El porcentaje de supervivencia se calculó como el recuento absoluto de blastos de mieloma múltiple vivos en la muestra tratada normalizada con respecto a células de mieloma múltiple vivas en el control no tratado. Los cultivos que consisten en células T CAR+ dirigidas a BCMA generadas mediante el uso de AcM21581 VH/VL indujeron una citólisis robusta específica de diana de los blastos de mieloma múltiple de 2 pacientes recién diagnosticados y de 1 paciente con recaída. En la relación E:T 10:1, se lisaron el 87-94 % de los blastos de mieloma

múltiple. Las células T no transducidas y expandidas (MOI 0) lisaron entre el 34 % y el 0 % de los blastos de mieloma múltiple. Este resultado demuestra la capacidad de las células T CAR+ dirigidas a BCMA para lisar potentemente los blastos de mieloma múltiple derivados del paciente de una manera específica de la diana. Los resultados se muestran en la Tabla 8, más abajo.

Tabla 8: % de supervivencia de los blastos de mieloma múltiple en la citólisis mediada por células T CAR dirigidas por BCMA

ID de la muestra	MM453		MM511		MM455	
Estado de la enfermedad	recién diagnosticado		recién diagnosticado		recaída	
% de blastos de MM	25 %		38 %		90 %	
BCMA ABC en MM	12302		2631		46925	
Relación de células T:células diana	T CAR BCMA	control T	T CAR BCMA	control T	T CAR BCMA	control T
10	7	66	11	85	13	156
5	15	66	19	91	32	155
2,5	23	90	28	82	81	148
1,25	49	77	37	92	81	104
0,625	82	92	56	92	98	112
0,312	108	92	100	100	98	102

El alcance de la presente invención no se limita a las modalidades descritas en la presente descripción. De hecho, diversas modificaciones de la invención, además de aquellas que se describen en la presente descripción, serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior. Se pretende que tales modificaciones se encuentren dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

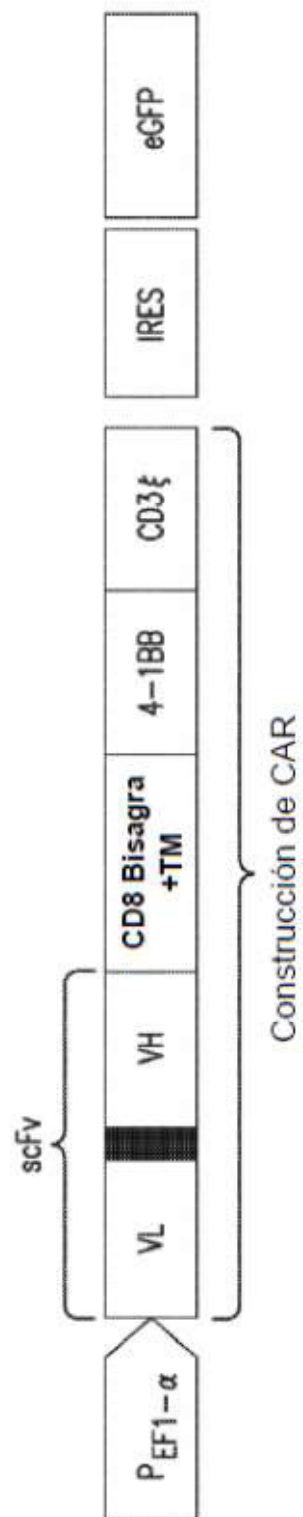


FIGURA 1

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> Receptores Antigénicos Quiméricos con Especificidad
Para BCMA
y Usos de Estos

<130> 10455WO01

<160> 101

<170> FastSEQ for Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 366

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintética

<400> 1

caggtgcagc tgggtggagtc ggggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc
cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt acctatggca ttcactgggt
ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atattacatg atggaagtag
taactactat 180

gcagagtccg tgaagggccg attcatcatc tccagagaca attccaagaa
cacactgtat 240

ctgcaaatac acagcctgag agctgaggac acggctctat attactgtac
gaaaaggtat 300

tcagaagcag ctggcccaaa ttggttcgac ccctggggcc agggaaccct
ggtcaccgct 360

tcctca

366

<210> 2

<211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintética

<400> 2

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly
Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr
Tyr
20 25 30
Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
Val
35 40 45
Ala Val Ile Leu His Asp Gly Ser Ser Asn Tyr Tyr Ala Glu Ser
Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
Tyr
65 70 75
80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr
Cys
85 90 95
Thr Lys Arg Tyr Ser Glu Ala Ala Gly Pro Asn Trp Phe Asp Pro
Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintética

<400> 3

ggattcacct tcagtaccta tggc
24

<210> 4

<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 4
Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Gly
1 5

<210> 5
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 5
atattacatg atggaagtag taac
24

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 6
Ile Leu His Asp Gly Ser Ser Asn
1 5

<210> 7
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 7

acgaaaaggt attcagaagc agctggccca aattggttcg acccc
45

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintética

<400> 8

Thr	Lys	Arg	Tyr	Ser	Glu	Ala	Ala	Gly	Pro	Asn	Trp	Phe	Asp	Pro
1				5					10					15

<210> 9

<211> 321

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintética

<400> 9

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc gtgtctgcat ctgtaggaga
cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtcg ggggaattagc agctggtttag cctgggtatca
gcagaagcca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatccatgct gcatccagtt tgcaaagtgg
ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag
cctgcagcct 240
gaagattttg ctacttacta ttgtcaacag gctatcagtt tcccattcac
tttcggccct 300
gggaccaaag tggatatcaa a
321

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintética

<400> 10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val
Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Gly Ile Ser Ser
Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
Ile
35 40 45
His Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
Pro
65 70 75
80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Ile Ser Phe Pro
Phe
85 90 95
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 11

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintética

<400> 11

cggggaatta gcagctgg
18

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintética

<400> 12

Arg Gly Ile Ser Ser Trp
1 5

<210> 13

<211> 9

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintética

<400> 13

gctgcatcc
9

<210> 14

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintética

<400> 14

Ala Ala Ser
1

<210> 15

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintética

<400> 15

caacaggcta tcagtttccc attcact
27

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 16
Gln Gln Ala Ile Ser Phe Pro Phe Thr
1 5

<210> 17
<211> 360
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 17
gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc
cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgtca tgagttgggt
ccgccaggct 120
ccaggggaagg gactggagtg ggtctcagct attattggta gtggtggtag
cacatattac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa
cacgctgtat 240
ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc
gaaaagagcc 300
ggggataact ggaactgggt cgacccctgg ggccagggaa ccctgggtcac
cgtctcctca 360

<210> 18
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintética

<400> 18

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
Gly

1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser
Tyr

20 25 30
Val Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
Val

35 40 45
Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
Val

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

65 70 75
80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
Cys

85 90 95
Ala Lys Arg Ala Gly Asp Asn Trp Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly
Gln

100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 19

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintética

<400> 19

ggattcacct ttagcagcta tgtc
24

<210> 20

<211> 8

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 20
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Val
1 5

<210> 21
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 21
attattggta gtggtggtag caca
24

<210> 22
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 22
Ile Ile Gly Ser Gly Gly Ser Thr
1 5

<210> 23
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 23
gcgaaaagag ccggggataa ctggaactgg ttcgacccc
39

<210> 24
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 24
Ala Lys Arg Ala Gly Asp Asn Trp Asn Trp Phe Asp Pro
1 5 10

<210> 25
<211> 321
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 25
gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctttaggaga
cagagtcacc 60
atcacttggtc gggcgagtca ggggtattagc agctgggtag cctgggtatca
gcggaaccca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg
ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tggggcggat ttcactctca ccatcagcag
cctgcagcct 240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaaaagtg tcccattcac
tttcgggcct 300
gggaccaaag tggatatcaa a
321

<210> 26
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintética

<400> 26

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Leu
Gly

1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser
Trp

20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
Ile

35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
Gly

50 55 60
Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
Pro

65 70 75
80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Lys Ser Val Pro
Phe

85 90 95
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 27

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintética

<400> 27

cagggtatta gcagctgg

18

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintética

<400> 28

Gln Gly Ile Ser Ser Trp

1

5

<210> 29

<211> 9

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintética

<400> 29

gctgcatcc

9

<210> 30

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintética

<400> 30

Ala Ala Ser

1

<210> 31

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintética

<400> 31

caacaggcta aaagtgtccc attcact

27

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 32
Gln Gln Ala Lys Ser Val Pro Phe Thr
1 5

<210> 33
<211> 351
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 33
gaagtgcagc tgggtggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctggcaggtc
cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatgcca tgcactgggt
ccggcaagct 120
ccaggggaagg gcctggagtg ggtctcaggt atcagttgga atagtggtaa
catgggatat 180
gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa
ctccctgttc 240
ctgcaaatgc acagtttgag agctgaggac acggcctttt attactgtgc
aaaagtccgt 300
ctaactgcct ttgacttttg gggccaggga accctgggtca ccgtctcctc a
351

<210> 34
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 34

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp
Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
Val
35 40 45
Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Asn Met Gly Tyr Ala Asp Ser
Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu
Phe
65 70 75
80
Leu Gln Met His Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Tyr
Cys
85 90 95
Ala Lys Val Arg Leu Thr Ala Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 35

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintética

<400> 35

ggattcacct ttgatgatta tgcc
24

<210> 36

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 36
Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala
1 5

<210> 37
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 37
atcagttgga atagtggtaa catg
24

<210> 38
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 38
Ile Ser Trp Asn Ser Gly Asn Met
1 5

<210> 39
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 39
gcaaaagtcc gtctaactgc ctttgacttt
30

<210> 40
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 40
Ala Lys Val Arg Leu Thr Ala Phe Asp Phe
1 5 10

<210> 41
<211> 321
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 41
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga
cagagtcacc 60
atcacttgcc ggacaagtca gagcattggc aactatttaa attggtttca
gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaaactcct catctatact gcatccagtt tgcagaatgg
agtcccatca 180
aggttcactg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag
tctgcaacct 240
gaggattttg taatttacta ctgtcaacag agtttcagta ccccgatac
ttttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa a
321

<210> 42
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 42

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
Gly

1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Asn
Tyr

20 25 30
Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
Ile

35 40 45
Tyr Thr Ala Ser Ser Leu Gln Asn Gly Val Pro Ser Arg Phe Thr
Gly

50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
Pro

65 70 75
80
Glu Asp Phe Val Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Phe Ser Thr Pro
Tyr

85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 43

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintética

<400> 43

cagagcattg gcaactat

18

<210> 44

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintética

<400> 44
Gln Ser Ile Gly Asn Tyr
1 5

<210> 45
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 45
actgcatcc
9

<210> 46
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 46
Thr Ala Ser
1

<210> 47
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 47
caacagagtt tcagtacccc gtatact
27

<210> 48
<211> 9

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 48
Gln Gln Ser Phe Ser Thr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 49
<211> 354
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 49
caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttgggtcaagc ctggaggggtc
cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactactaca tcagctggat
ccgccaggct 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtttcatac attagttcta gtggtagttc
cataaagtac 180
gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaagaa
ctcactgtat 240
ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc
gagagaggga 300
gggaactacg gtatggacgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctca
354

<210> 50
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 50
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly
Gly

<400> 52
Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr
1 5

<210> 53
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 53
attagttcta gtggtagttc cata
24

<210> 54
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 54
Ile Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ile
1 5

<210> 55
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 55
gcgagagagg gagggaacta cggtatggac gtc
33

<210> 56
<211> 11

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 56
Ala Arg Glu Gly Gly Asn Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 57
<211> 321
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 57
gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga
cagagtcacc 60
atcacttggtc gggcgagtc ggggtattaac aactgggttag tctgggtatca
gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcaaccagct tgcaaagtgg
ggtcccatca 180
agggttcagcg gcagtgggtc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag
cctgcagcct 240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tccctccac
ttttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa a
321

<210> 58
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 58
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val
Gly

1		5		10		15
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys
Trp						
		20		25		30
Leu	Val	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys
Ile						
	35		40		45	
Tyr	Ala	Ala	Thr	Ser	Leu	Gln
Gly						
	50		55		60	
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
Pro						
65			70		75	
80						
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr
Pro						
		85		90		95
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys
		100		105		

<210> 59
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

<400> 59
 cagggtatta acaactgg
 18

<210> 60
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

<400> 60
 Gln Gly Ile Asn Asn Trp
 1 5

<210> 61
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 61
gctgcaacc
9

<210> 62
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 62
Ala Ala Thr
1

<210> 63
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 63
caacaggcta acagtttccc tcccact
27

<210> 64
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintética

<400> 64

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro Thr
1 5

<210> 65

<211> 375

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintética

<400> 65

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttgggtccagc ctggggggggtc
cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt aacttttgga tgacctgggt
ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtggccaac atgaaccaag atggaagtga
gaaatactat 180
gtggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagag
ctcactgtat 240
ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc
gagagatcgg 300
gaatattgta ttagtaccag ctgctatgat gactttgact actggggcca
gggaaccctg 360
gtcaccgtct cctca
375

<210> 66

<211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintética

<400> 66

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

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asn
Phe														
			20					25					30	
Trp	Met	Thr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp
Val														
		35					40					45		
Ala	Asn	Met	Asn	Gln	Asp	Gly	Ser	Glu	Lys	Tyr	Tyr	Val	Asp	Ser
Val														
	50					55					60			
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Ser	Ser	Leu
Tyr														
65					70					75				
80														
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr
Cys														
			85						90				95	
Ala	Arg	Asp	Arg	Glu	Tyr	Cys	Ile	Ser	Thr	Ser	Cys	Tyr	Asp	Asp
Phe														
		100						105				110		
Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser		
		115					120					125		

<210> 67
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

<400> 67
 ggattcacct ttagtaactt ttgg
 24

<210> 68
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

<400> 68

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe Trp
1 5

<210> 69
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 69
atgaaccaag atggaagtga gaaa
24

<210> 70
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 70
Met Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys
1 5

<210> 71
<211> 54
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 71
gcgagagatc gggaatattg tattagtacc agctgctatg atgactttga ctac
54

<210> 72
<211> 18
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintética

<400> 72

Ala Arg Asp Arg Glu Tyr Cys Ile Ser Thr Ser Cys Tyr Asp Asp
Phe

1 5 10 15
Asp Tyr

<210> 73

<211> 324

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintética

<400> 73

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga
cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca
gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcatagtgg
ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag
tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat
caccttcggc 300

caagggacac gactggagat taaa
324

<210> 74

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintética

<400> 74

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val
Gly														
1				5					10					15
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser
Tyr														
			20					25					30	
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu
Ile														
			35					40				45		
Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser
Gly														
			50			55				60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln
Pro														
65					70					75				
80														
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Tyr	Ser	Thr	Pro
Pro														
				85					90					95
Ile	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys			
			100					105						

<210> 75
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

<400> 75
 cagagcatta gcagctat
 18

<210> 76
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

<400> 76

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5

<210> 77
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 77
gctgcatcc
9

<210> 78
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 78
Ala Ala Ser
1

<210> 79
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 79
caacagagtt acagtacccc tccgatcacc
30

<210> 80
<211> 10
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintética

<400> 80

Gln	Gln	Ser	Tyr	Ser	Thr	Pro	Pro	Ile	Thr
1				5				10	

<210> 81

<211> 1404

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> BCMA 16711 (VL-VH) ScFv CAR-T
(16711_VK_v2(humana).(G4S)3 Enlazador.16711 VH.hCD8a
bisagra/TM.hCD137 (4-1BB).hCD3 zeta)

<400> 81

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc gtgtctgcat ctgtaggaga
cagagtcacc 60
atcacttgct gggcgagtcg ggggaattagc agctggtttag cctgggtatca
gcagaagcca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatccatgct gcatccagtt tgcaaagtgg
ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag
cctgcagcct 240
gaagattttg ctacttacta ttgtcaacag gctatcagtt tcccattcac
tttcggccct 300
gggaccaaag tggatatcaa aggcggcggg ggatctggag gcggtggaag
cggtggcggg 360
ggaagtcagg tgcagctggg ggagtcgggg ggaggcgtgg tccagcctgg
gaggtccctg 420
agactctcct gtgcagcctc tggattcacc ttcagtacct atggcattca
ctgggtccgc 480
caggctccag gcaaggggct ggagtgggtg gcagttatat tacatgatgg
aagtagtaac 540
tactatgcag agtccgtgaa gggccgattc atcatctcca gagacaattc
caagaacaca 600
ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagct gaggacacgg ctctatatta
ctgtacgaaa 660

```

aggtattcag aagcagctgg cccaaattgg ttcgaccctt ggggccaggg
aaccctgggtc 720
accgtctcct caactaccac tcctgctccc cgccccccaa cacctgctcc
aactattgca 780
tccaaccac tctccctcag acccgaagct tgcgcgcccg ccgccggagg
tgctgttcac 840
actagaggac tcgattttgc ttgcgacatt tatatctggg cccacttgc
aggtacttgc 900
ggagtattgc tgctctcact tggtattact ctttattgca aacggggcag
aaagaaactc 960
ctgtatatat tcaacaacc atttatgaga ccagtacaaa ctactcaaga
ggaagatggc 1020
tgtagctgcc gatttccaga agaagaagaa ggaggatgtg aactgagagt
gaagttcagc 1080
aggagcgcag acgccccgcg gtacaagcag ggccagaacc agctctataa
cgagctcaat 1140
ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg gacaagagac gtggccggga
ccctgagatg 1200
gggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag gaaggcctgt acaatgaact
gcagaaagat 1260
aagatggcgg aggcctacag tgagattggg atgaaaggcg agcgccggag
gggcaagggg 1320
cacgatggcc tttaccaggg tctcagtaca gccaccaagg acacctacga
cgcccttcac 1380
atgcaggccc tgccccctcg ctaa
1404

```

```

<210> 82
<211> 467
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

```

```

<220>
<223> BCMA 16711 (VL-VH) ScFv CAR-T
      (16711_VK_v2(humana).(G4S)3 Enlazador.16711 VH.hCD8a
      bisagra/TM.hCD137 (4-1BB).hCD3 zeta)

```

```

<400> 82
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val
Gly
  1             5             10             15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Gly Ile Ser Ser
Trp

```

			20					25				30		
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu
Ile														
		35					40					45		
His	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser
Gly														
	50					55					60			
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln
Pro														
65					70					75				
80														
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ala	Ile	Ser	Phe	Pro
Phe														
			85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly
Ser														
		100					105					110		
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val
Glu														
	115					120				125				
Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser
Cys														
	130					135				140				
Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Thr	Tyr	Gly	Ile	His	Trp	Val
Arg														
145					150					155				
160														
Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Val	Ile	Leu	His
Asp														
		165						170					175	
Gly	Ser	Ser	Asn	Tyr	Tyr	Ala	Glu	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Ile
Ile														
		180						185					190	
Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser
Leu														
	195					200						205		
Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Lys	Arg	Tyr	Ser
Glu														
	210					215						220		
Ala	Ala	Gly	Pro	Asn	Trp	Phe	Asp	Pro	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
Val														
225					230					235				
240														

Thr	Val	Ser	Ser	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro
Ala														
				245					250					255
Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys
Arg														
			260					265					270	
Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala
Cys														
	275						280					285		
Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu
Leu														
	290					295					300			
Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys
Leu														
305					310					315				
320														
Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr
Gln														
				325					330					335
Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly
Gly														
			340					345					350	
Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala
Tyr														
	355						360					365		
Lys	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg
Arg														
	370					375					380			
Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu
Met														
385					390					395				
400														
Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn
Glu														
				405					410					415
Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met
Lys														
			420					425					430	
Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly
Leu														
	435						440					445		
Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala
Leu														
	450					455					460			

Pro Pro Arg
465

<210> 83
<211> 1398
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> BCMA 16716 (VL-VH) ScFv CAR-T
(16716_VK(humana).(G4S)3
Enlazador.16716_VH(humana).hCD8a bisagra/TM.hCD137
(4-1BB).hCD3 zeta)

<400> 83
gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctttaggaga
cagagtcacc 60
atcacttgct gggcgagtca ggggtattagc agctgggttag cctgggtatca
gcggaaccca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg
ggtcccatca 180
agggttcagcg gcagtggatc tggggcggat ttcactctca ccatcagcag
cctgcagcct 240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaaaagtg tcccattcac
tttcggccct 300
gggaccaaag tggatatcaa aggcggcggt ggatctggag gcggtggaag
cgggtggcggg 360
ggaagtgagg tgcagctggt ggagtctggg ggaggcttgg tacagcctgg
ggggtccctg 420
agactctcct gtgcagcctc tggattcacc tttagcagct atgtcatgag
ttgggtccgc 480
caggctccag ggaagggact ggagtgggtc tcagctatta ttggtagtgg
tggtagcaca 540
tattacgcag actccgtgaa gggccggttc accatctcca gagacaattc
caagaacacg 600
ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtatatatta
ctgtgcgaaa 660
agagccgggg ataactggaa ctggttcgac ccctggggcc agggaaccct
ggtcacgcgtc 720
tcctcaacta ccaactcctgc tccccgcccc ccaacacctg ctccaactat
tgcattccaa 780

```

ccactctccc tcagaccgga agcttgctgc cccgccgccg gaggtgctgt
tcacactaga 840
ggactcgatt ttgcttgcca catttatatc tgggccccac ttgcaggtag
ttgcggagta 900
ttgctgctct cacttggttat tactctttat tgcaaacggg gcagaaagaa
actcctgtat 960
atattcaaac aaccatttat gagaccagta caaactactc aagaggaaga
tggctgtagc 1020
tgccgatttc cagaagaaga agaaggagga tgtgaactga gagtgaagtt
cagcaggagc 1080
gcagacgccc ccgcgtacaa gcagggccag aaccagctct ataacgagct
caatctagga 1140
cgaagagagg agtacgatgt tttggacaag agacgtggcc gggaccctga
gatgggggga 1200
aagccgagaa ggaagaaccc tcaggaaggc ctgtacaatg aactgcagaa
agataagatg 1260
gcgagggcct acagtgagat tgggatgaaa ggcgagcgcc ggaggggcaa
ggggcacgat 1320
ggcctttacc aggttctcag tacagccacc aaggacacct acgacgccct
tcacatgcag 1380
gccctgcccc ctcgctaa
1398

```

```

<210> 84
<211> 465
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

```

```

<220>
<223> BCMA 16716 (VL-VH) ScFv CAR-T
      (16716_VK(humana).(G4S)3
      Enlazador.16716_VH(humana).hCD8a bisagra/TM.hCD137
      (4-1BB).hCD3 zeta)

```

```

<400> 84
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Leu
Gly
  1             5             10             15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser
Trp
          20             25             30
Leu Ala Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
Ile
      35             40             45

```

Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser
Gly														
	50					55				60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Ala	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln
Pro														
65					70					75				
80														
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ala	Lys	Ser	Val	Pro
Phe														
				85					90					95
Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly
Ser														
			100					105					110	
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val
Glu														
		115					120					125		
Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser
Cys														
	130					135				140				
Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Val	Met	Ser	Trp	Val
Arg														
145					150					155				
160														
Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Ala	Ile	Ile	Gly
Ser														
				165					170				175	
Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr
Ile														
			180					185					190	
Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser
Leu														
		195					200					205		
Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Arg	Ala	Gly
Asp														
	210					215					220			
Asn	Trp	Asn	Trp	Phe	Asp	Pro	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr
Val														
225					230					235				
240														
Ser	Ser	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro
Thr														
				245				250					255	
Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro
Ala														

			260					265				270			
Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	
Ile															
		275						280				285			
Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	
Ser															
	290					295					300				
Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	
Tyr															
305					310					315					
320															
Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	
Glu															
			325					330					335		
Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	
Glu															
		340						345				350			
Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Lys	
Gln															
	355						360				365				
Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	
Glu															
	370					375				380					
Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	
Gly															
385					390					395					
400															
Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	
Gln															
			405					410					415		
Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	
Glu															
		420						425				430			
Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	
Thr															
	435						440					445			
Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	
Pro															
	450					455					460				
Arg															
465															

<210> 85

<211> 1389

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> BCMA 16732 (VL-VH) ScFv CAR-T

(16732_VK_v2(humana).(G4S)3

Enlazador.16732_VH(humana).hCD8a bisagra/TM.hCD137
(4-1BB).hCD3 zeta)

<400> 85

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga
cagagtcacc 60

atcacttgcc ggacaagtca gagcattggc aactatttaa attggtttca
gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaaactcct catctatact gcatccagtt tgcagaatgg
agtcccatca 180

aggttcactg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag
tctgcaacct 240

gaggattttg taatttacta ctgtcaacag agtttcagta ccccgataac
ttttggccag 300

gggaccaagc tggagatcaa aggcggcggg ggatctggag gcgggtggaag
cgggtggcggg 360

ggaagtgaag tgcagctggg ggagtctggg ggaggcttgg tacagcctgg
caggtccctg 420

agactctcct gtgcagcctc tggattcacc tttgatgatt atgccatgca
ctgggtccgg 480

caagctccag ggaagggcct ggagtgggtc tcaggatatca gttggaatag
tggtaacatg 540

ggatatgcgg actctgtgaa gggccgattc accatctcca gagacaacgc
caagaactcc 600

ctgttcctgc aaatgcacag tttgagagct gaggacacgg ccttttatta
ctgtgcaaaa 660

gtccgtctaa ctgcctttga cttttggggc cagggaaccc tggtcaccgt
ctcctcaact 720

accactcctg ctccccgccc cccaacacct gctccaacta ttgcatccca
accactctcc 780

ctcagaccgg aagcttgctg ccccgccgcc ggagggtgctg ttcacactag
aggactcgat 840

tttgcttgcg acatttatat ctgggccccca cttgcaggta cttgcggagt
attgctgctc 900

tcacttggtta ttactcttta ttgcaaacgg ggcagaaaga aactcctgta
tatattcaaa 960

caaccatttta tgagaccagt acaaactact caagaggaag atggctgtag
 ctgccgattt 1020
 ccagaagaag aagaaggagg atgtgaactg agagtgaagt tcagcaggag
 cgcagacgcc 1080
 cccgcgtaca agcagggcca gaaccagctc tataacgagc tcaatctagg
 acgaagagag 1140
 gagtacgatg ttttggacaa gagacgtggc cgggaccctg agatgggggg
 aaagccgaga 1200
 aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat gaactgcaga aagataagat
 ggcggaggcc 1260
 tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc cggaggggca aggggcacga
 tggcctttac 1320
 caggggtctca gtacagccac caaggacacc tacgacgccc ttcacatgca
 ggccctgccc 1380
 cctcgctaa
 1389

<210> 86
 <211> 462
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> BCMA 16732 (VL-VH) ScFv CAR-T
 (16732_VK_v2(humana).(G4S)3
 Enlazador.16732_VH(humana).hCD8a bisagra/TM.hCD137
 (4-1BB).hCD3 zeta)

<400> 86
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Asn
 Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
 Ile
 35 40 45
 Tyr Thr Ala Ser Ser Leu Gln Asn Gly Val Pro Ser Arg Phe Thr
 Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 Pro

65					70					75					
80															
Glu	Asp	Phe	Val	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Phe	Ser	Thr	Pro	
Tyr															
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	
Ser															
			100					105					110		
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	
Glu															
		115					120					125			
Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	
Cys															
	130					135				140					
Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Asp	Tyr	Ala	Met	His	Trp	Val	
Arg															
145					150					155					
160															
Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Gly	Ile	Ser	Trp	
Asn															
				165				170					175		
Ser	Gly	Asn	Met	Gly	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	
Ile															
		180						185					190		
Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Phe	Leu	Gln	Met	His	Ser	
Leu															
	195					200					205				
Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Phe	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Val	Arg	Leu	
Thr															
	210					215					220				
Ala	Phe	Asp	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	
Thr															
225					230					235					
240															
Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	
Ser															
				245				250					255		
Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	
Gly															
		260					265					270			
Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	
Trp															
		275					280					285			

Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val
Ile														
	290					295					300			
Thr	Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe
Lys														
305					310						315			
320														
Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly
Cys														
				325					330					335
Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg
Val														
			340					345					350	
Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Lys	Gln	Gly	Gln
Asn														
		355					360					365		
Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp
Val														
	370					375					380			
Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro
Arg														
385					390						395			
400														
Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp
Lys														
				405					410					415
Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg
Arg														
			420					425					430	
Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr
Lys														
		435					440					445		
Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg	
	450					455					460			

<210> 87

<211> 1392

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> BCMA 16747 (VL-VH) ScFv CAR-T
(16747_VK(humana) . (G4S) 3

Enlazador.16747_VH(humana).hCD8a bisagra/TM.hCD137
(4-1BB).hCD3 zeta)

<400> 87

```

gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga
cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtca gggattataac aactggtttag tctggatatca
gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcaaccagct tgcaaagtgg
ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtgggtc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag
cctgcagcct 240
gaagatthttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tccctccac
ttttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa aggcggcggg ggatctggag gcgggtggaag
cgggtggcggg 360
ggaagtcagg tgcagctggg ggagtctggg ggaggcttgg tcaagcctgg
agggtccttg 420
agactctcct gtgcagcctc tggattcacc ttcagtgact actacatcag
ctggatccgc 480
caggctccag ggaaggggct ggagtggggt tcatacatta gttctagtgg
tagttccata 540
aagtacgcag actctgtgaa gggccgattc accatctcca gggacaacgc
caagaactca 600
ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtatatatta
ctgtgcgaga 660
gagggaggga actacgggat ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac
cgtctcctca 720
actaccactc ctgctccccg ccccccaaca cctgctccaa ctattgcatc
ccaaccactc 780
tccctcagac ccgaagcttg tcgccccgcc gccggagggtg ctgttcacac
tagaggactc 840
gatttttgctt gcgacattta tatctgggcc ccacttgcag gtacttgcgg
agtattgctg 900
ctctcacttg ttattactct ttattgcaaa cggggcagaa agaaactcct
gtatatattc 960
aaacaacat ttatgagacc agtacaaact actcaagagg aagatggctg
tagctgccga 1020
tttccagaag aagaagaagg aggatgtgaa ctgagagtga agttcagcag
gagcgcagac 1080
gccccgcgt acaagcaggg ccagaaccag ctctataacg agctcaatct
aggacgaaga 1140
gaggagtacg atgttttgga caagagacgt ggccgggacc ctgagatggg
gggaaagccg 1200

```

agaaggaaga accctcagga aggcctgtac aatgaactgc agaaagataa
gatggcggag 1260
gcctacagtg agattgggat gaaaggcgag cgccggaggg gcaaggggca
cgatggcctt 1320
taccagggtc tcagtacagc caccaaggac acctacgacg cccttcacat
gcaggccctg 1380
ccccctcgct aa
1392

<210> 88
<211> 463
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> BCMA 16747 (VL-VH) ScFv CAR-T
(16747_VK(humana).(G4S)3
Enlazador.16747_VH(humana).hCD8a bisagra/TM.hCD137
(4-1BB).hCD3 zeta)

<400> 88
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val
Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn
Trp
20 25 30
Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Thr Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
Pro
65 70 75
80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro
Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly
Ser
100 105 110

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


```

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcatagtgg
ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag
tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat
caccttcggc 300
caagggacac gactggagat taaaggcggc ggtggatctg gaggcggtgg
aagcgggtgg 360
gggggaagtg aggtgcagct ggtggagtct gggggaggct tgggtccagcc
tgggggggtcc 420
ctgagactct cctgtgcagc ctctggattc acctttagta acttttggat
gacctgggtc 480
cgccaggctc caggggaagg gctggagtgg gtggccaaca tgaaccaaga
tggaagtgag 540
aaatactatg tggactctgt gaagggccga ttcaccatct ccagagacaa
cgccaagagc 600
tactgtatc tgcaaataaa cagcctgaga gccgaggaca cggctgtgta
ttactgtgcg 660
agagatcggg aatattgtat tagtaccagc tgctatgatg actttgacta
ctggggccag 720
ggaaccctgg tcaccgtctc ctcaggaggc ggaggcagca ctaccactcc
tgctccccgc 780
cccccaacac ctgctccaac tattgcatcc caaccactct ccctcagacc
cgaagcttgt 840
cgccccgccg ccggaggtgc tgttcacact agaggactcg attttgcttg
cgacatttat 900
atctgggccc cacttgcagg tacttgcgga gtattgctgc tctcacttgt
tattactctt 960
tattgcaaac ggggcagaaa gaaactcctg tatatatattca aacaaccatt
tatgagacca 1020
gtacaaacta ctcaagagga agatggctgt agctgccgat ttccagaaga
agaagaagga 1080
ggatgtgaac tgagagtga gttcagcagg agcgcagacg cccccgcgta
caagcagggc 1140
cagaaccagc tctataacga gctcaatcta ggacgaagag aggagtacga
tgttttggac 1200
aagagacgtg gccgggaccc tgagatgggg ggaaagccga gaaggaagaa
ccctcaggaa 1260
ggcctgtaca atgaactgca gaaagataag atggcggagg cctacagtga
gattgggatg 1320
aaaggcgagc gccggagggg caaggggcac gatggccttt accagggctc
cagtacagcc 1380
accaaggaca cctacgacgc ccttcacatg caggccctgc cccctcgcta a
1431

```

<210> 90
 <211> 476
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> BCMA 21581 (VL-VH) ScFv CAR-T
 (21581 VK(humana).(G4S)3 Enlazador.21581
 VH(humana).G4S Enlazador_v2.hCD8a bisagra/TM.hCD137
 (4-1BB).hCD3 zeta)

<400> 90
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser
 Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
 Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 Pro
 65 70 75
 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro
 Pro
 85 90 95
 Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly
 Gly
 100 105 110
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
 Val
 115 120 125
 Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
 Ser
 130 135 140
 Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe Trp Met Thr Trp
 Val

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

Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln
 Leu
 370 375 380
 Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
 Asp
 385 390 395
 400
 Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg
 Lys
 405 410 415
 Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met
 Ala
 420 425 430
 Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly
 Lys
 435 440 445
 Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp
 Thr
 450 455 460
 Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 465 470 475

<210> 91

<211> 1437

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> HLA-A2/HPV16E7(11-19) 17363 ScFv (VL-VH) CAR-T

(Control Irrelevante)

(17363_ULC-VK(1) (humana).G4Sx3_4.17363_VH(humana).

G4S_V2.hCD8a bisagra/TM.hCD137 (4-1BB).hCD3 zeta)

<400> 91

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga

cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca

acagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gtttccatth tgcaaagtgg

ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcaactc

tctgcaacct 240

```

gaagatTTTTG caacttactc ctgtcaacag acttacagta cccctccgat
caccttcggc 300
caagggacac gactggagat taaaggtgga ggcggtagtg gcggaggcgg
aagtgggtgga 360
ggaggctcag aggtgcagct gttggagtct gggggaggct tgggtacaacc
tgggggggtcc 420
ctgagactct cctgtgcagc ctctggattc acctttagca gttatgccat
gacctggggtc 480
cgccaggctc cagggatggg actggagtgg gtctcagtta ttagtggttag
tggtagtgaa 540
acatactacg cagactccgt gaagggccgg ttcaccatct ccagagacaa
ttccaaaaac 600
acactgtatc tgcaaatgaa cagcctgaga gccgaagaca cggccgtata
ttactgtgtg 660
aaagattctt cgtataggag ctctctcagg gcctactact actacggaat
ggacgtcttg 720
ggcctagggg ccacggtcac cgtctcctca ggaggtgggtg gaagtactac
cactcctgct 780
ccccgcccc caacacctgc tccaactatt gcatcccaac cactctccct
cagacccgaa 840
gcttgctgcc ccgccgccgg aggtgctggt cacactagag gactcgattt
tgcttgcgac 900
atttatatct gggccccact tgcagggtact tgcggagtat tgctgctctc
acttgttatt 960
actctttatt gcaaacgggg cagaaagaaa ctctgtata tattcaaaca
accatttatg 1020
agaccagtac aaactactca agaggaagat ggctgtagct gccgatttcc
agaagaagaa 1080
gaaggaggat gtgaactgag agtgaagttc agcaggagcg cagacgcccc
cgcgtacaag 1140
cagggccaga accagctcta taacgagctc aatctaggac gaagagagga
gtacgatgtt 1200
ttggacaaga gacgtggccg ggaccctgag atgggggggaa agccgagaag
gaagaaccct 1260
caggaaggcc tgtacaatga actgcagaaa gataagatgg cggaggccta
cagtgaatt 1320
gggatgaaag gcgagcgccg gaggggcaag gggcacgatg gcctttacca
gggtctcagt 1380
acagccacca aggacaccta cgacgccctt cacatgcagg ccctgcccc
tcgctaa 1437

```

<210> 92

<211> 478

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> HLA-A2/HPV16E7(11-19) 17363 ScFv (VL-VH) CAR-T

(Control Irrelevante)

(17363_ULC-VK(1)(humana).G4Sx3_4.17363_VH(humana).

G4S_V2.hCD8a bisagra/TM.hCD137(4-1BB).hCD3 zeta)

<400> 92

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
Gly

1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser
Tyr

20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
Ile

35 40 45
Tyr Ala Val Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
Gly

50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln
Pro

65 70 75
80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Ser Cys Gln Gln Thr Tyr Ser Thr Pro
Pro

85 90 95
Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly
Gly

100 105 110
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
Leu

115 120 125
Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
Ser

130 135 140
Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Thr Trp
Val

145 150 155
160

Arg Gln Ala Pro Gly Met Gly Leu Glu Trp Val Ser Val Ile Ser
Gly

				165					170					175
Ser	Gly	Ser	Glu	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe
Thr														
			180					185					190	
Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn
Ser														
		195					200					205		
Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Val	Lys	Asp	Ser
Ser														
	210					215					220			
Tyr	Arg	Ser	Ser	Ser	Arg	Ala	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Val
Trp														
225					230					235				
240														
Gly	Leu	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
Thr														
			245						250					255
Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala
Ser														
		260						265					270	
Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly
Gly														
		275					280					285		
Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile
Trp														
	290					295					300			
Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val
Ile														
305					310					315				
320														
Thr	Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe
Lys														
			325					330						335
Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly
Cys														
		340						345					350	
Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg
Val														
	355					360					365			
Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Lys	Gln	Gly	Gln
Asn														
	370				375					380				
Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp
Val														

<210> 95
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> enlazador

<400> 95
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 96
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> enlazador

<400> 96
 Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
 Thr
 1 5 10 15
 Lys Gly

<210> 97
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> bisagra

<400> 97
 Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile
 Ala
 1 5 10 15
 Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala
 Gly
 20 25 30

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
35 40 45

<210> 98
<211> 24
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Dominio TM

<400> 98
Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu
Leu
1 5 10 15
Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
20

<210> 99
<211> 42
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 4-1BB

<400> 99
Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe
Met
1 5 10 15
Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg
Phe
20 25 30
Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
35 40

<210> 100
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cd3-Zeta

<400> 100

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln
Gly

1 5 10 15
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu
Tyr

20 25 30
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly
Lys

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

50 55 60
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
Arg

65 70 75
80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr
Ala

85 90 95
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
Arg

100 105 110

<210> 101

<211> 184

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> BCMA humana (TNFRSF17) Proteína NP_001183.2

<400> 101

Met Leu Gln Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp
Ser

1 5 10 15
Leu Leu His Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn
Thr

20 25 30

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

KAM\KAM\ID-930954\WPC16813