

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 973 946**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 35/17 (2015.01)

A61P 35/02 (2006.01)

C07K 14/725 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.07.2019** **PCT/US2019/042452**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.01.2020** **WO20018825**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2019** **E 19749097 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.01.2024** **EP 3823665**

54 Título: **Receptores de antígenos quiméricos con especificidad por el BCMA y usos de los mismos**

30 Prioridad:

19.07.2018 US 201862700615 P

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

25.06.2024

73 Titular/es:

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
(100.0%)

777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, NY 10591-6706, US

72 Inventor/es:

DILILLO, DAVID;
DELFINO, FRANK;
BRAY, KEVIN;
MEAGHER, THOMAS, CRAIG;
KIRSHNER, JESSICA y
SINESHCHEKOVA, OLGA

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

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

ES 2 973 946 T3

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

DESCRIPCIÓN

Receptores de antígenos quiméricos con especificidad por el BCMA y usos de los mismos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a receptores de antígenos quiméricos (CAR, *chimeric antigen receptors*) y a células diseñadas que comprenden dichos CAR, que son específicos para el antígeno de maduración de células B (BCMA, *B-cell maturation antigen*), y a métodos de uso de los mismos.

10 **Antecedentes**

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 fases de desarrollo. El BCMA se expresa exclusivamente en células del linaje de células B, particularmente en la región interfolicular del centro germinal, así como 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 vida en la médula ósea. En el mieloma múltiple, el BCMA se expresa ampliamente en células plasmáticas neoplásicas a niveles elevados, y la expresión del BCMA aumenta con la progresión de células normales a mieloma múltiple activo. El BCMA también se expresa en otras neoplasias malignas de células B, incluyendo macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma de Burkitt y linfoma difuso de células B grandes. Tai *et al.*, *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 víricas y cáncer. Las células T usadas para inmunoterapia adoptiva pueden generarse mediante expansión de células T específicas de antígeno o redirección de células T mediante ingeniería genética.

Se han conseguido generar nuevas especificidades en células T mediante la transferencia genética de receptores transgénicos de células T o receptores de antígenos quiméricos (CAR, *chimeric antigen receptors*) (Jena, Dotti *et al.* 2010). Los CAR son receptores sintéticos que consisten en un resto de direccionamiento que está asociado con uno o más dominios de señalización en una única molécula de fusión. En general, el resto de unión de un CAR consiste en un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo monocatenario (scFv), que comprende los fragmentos variables de la cadena ligera y pesada de un anticuerpo monoclonal unidos mediante un enlazador flexible. Los dominios de señalización de los CAR de primera generación proceden de la región citoplásmica de CD3zeta o de las cadenas gamma del receptor de Fc. Se ha mostrado que los CAR de primera generación redirigen con éxito la citotoxicidad de las células T. Sin embargo, no logran proporcionar una expansión prolongada ni actividad antitumoral *in vivo*. Dominios de señalización de moléculas coestimuladoras, así como dominios transmembrana y bisagra, se han añadido para formar los CAR de segunda y tercera generación, lo que ha dado lugar a algunos ensayos terapéuticos con éxito en seres humanos. Por ejemplo, células T redirigidas por CAR, específicas para el antígeno de diferenciación de células B, CD19, han demostrado tener una eficacia espectacular en el tratamiento de neoplasias malignas de células B, mientras que las células T redirigidas por TCR han mostrado tener beneficios en pacientes que padecen cáncer sólido. Stauss *et al.* describen estrategias para modificar CAR y TCR terapéuticos, para su uso en el tratamiento del cáncer, por ejemplo, para mejorar la función efectora específica del antígeno y limitar la toxicidad de las células T diseñadas (Current Opinion in Pharmacology 2015, 24:113-118).

Smith *et al.*, *Mol Ther.* 26(6):1447-1456, 2018 desvelan un vector de células T CAR dirigido a BCMA procedente de un fragmento variable monocatenario humano. Harrington *et al.*, *Blood* 130(S1):1813, 2017 desvelan JCARH125, un CAR anti-BCMA completamente humano para su uso en el tratamiento del mieloma múltiple. En el documento WO 2019/149249 se describe un receptor de antígeno quimérico (CAR) que puede unirse específicamente a una proteína BCMA que comprende un dominio estructural de unión a BCMA, un dominio transmembrana, un dominio coestimulador y un dominio de señalización intracelular.

Las células diseñadas que expresan receptores de antígenos quiméricos que se dirigen a BCMA serían útiles en entornos terapéuticos en los que se desea un direccionamiento específico y la destrucción mediada por células T de células que expresan BCMA.

60 **Breve resumen de la invención**

La presente invención proporciona receptores de antígenos quiméricos específicos para el antígeno de maduración de células B (BCMA) como se define en las reivindicaciones, ácidos nucleicos que codifican los CAR, vectores que comprenden los ácidos nucleicos y células que comprenden los ácidos nucleicos o vectores. La invención también proporciona células diseñadas que comprenden los CAR y métodos para obtener las células diseñadas. La invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden células T modificadas por ingeniería genética que comprenden los CAR o que comprenden las células diseñadas. La invención también proporciona las células

diseñadas para su uso en el tratamiento de un cáncer que expresa BCMA.

Sumario de las enseñanzas técnicas

5 La invención se define en las reivindicaciones. Todos los aspectos, realizaciones y ejemplos de la presente divulgación, que no entren en el alcance de las reivindicaciones adjuntas, no forman parte de la invención y se proporcionan únicamente a título ilustrativo.

10 En un aspecto, la presente invención proporciona un receptor de antígeno quimérico específico para el antígeno de maduración de células B (BCMA) que comprende, del extremo N al extremo C: (a) un dominio de unión a ligando extracelular que comprende un dominio de unión a 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 la invención, el dominio de unión a ligando extracelular comprende un dominio de fragmento variable monocatenario (scFv, *single chain variable fragment*) anti-BCMA que comprende una región variable de cadena ligera (LCVR, *light chain variable region*) y una región variable de cadena pesada (HCVR, *heavy chain variable region*). El dominio scFv anti-BCMA comprende un enlazador entre la LCVR y la HCVR. En algunos casos, el receptor de antígeno quimérico comprende además un enlazador entre el dominio de unión a ligando extracelular (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 realizaciones, el enlazador es un enlazador (G4S)_n, en donde n es 1-10.

25 En la invención, la bisagra y el dominio transmembrana son de CD8. En algunos casos, la bisagra, el dominio transmembrana o ambos, son de un polipéptido CD8α. En la invención, el dominio coestimulador comprende un dominio coestimulador 4-1BB. En la invención, el dominio de señalización comprende un dominio de señalización CD3zeta. En algunas realizaciones, la región bisagra comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97. En algunas realizaciones, el dominio transmembrana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98. En algunas realizaciones, el dominio coestimulador 4-1BB comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 99. En algunas realizaciones, el dominio de señalización CD3zeta comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 100.

30 En algunos aspectos de la divulgación, la LCVR comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR, *complementarity determining regions*) 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 aspectos de la divulgación, 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 aspectos de la divulgación, 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 aspectos de la divulgación, 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 la invención, la LCVR comprende los dominios LCDR1-LCDR2-LCDR3 expuestos en las SEQ ID NO: 60-62-64 respectivamente y la HCVR comprende los dominios HCDR1-HCDR2-HCDR3 expuestos en las SEQ ID NO: 52-54-56 respectivamente.

45 En algunas ocasiones, 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.

50 En algunas ocasiones, el dominio scFv comprende un par de secuencias de aminoácidos de 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 la invención, el dominio scFv puede comprender un par de secuencias de aminoácidos de LCVR/HCVR de las SEQ ID NO: 58/50. En algunos casos, la LCVR y la HCVR están unidas por un enlazador, opcionalmente un enlazador (G4S)_n en el que n=1-3.

60 En algunos aspectos de la divulgación, el receptor de antígeno quimérico comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88 o SEQ ID NO: 90. En algunos aspectos de la divulgación, el receptor de antígeno quimérico comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 82. En algunos aspectos de la divulgación, el receptor de antígeno quimérico comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84. En algunos aspectos de la divulgación, el receptor de antígeno quimérico comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 86. En la invención, el receptor de antígeno quimérico puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 88. En algunos aspectos de la divulgación, el receptor de antígeno quimérico comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 90.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un receptor de antígeno quimérico de la invención. En algunos aspectos de la divulgación, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 81, 83, 85, 87 y 89. En la invención, la molécula de ácido nucleico puede comprender una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 87.

5 En otro aspecto, la presente invención proporciona un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de la invención. En algunos casos, el vector es un vector de ADN, un vector de ARN, un plásmido, un vector lentivírico, un vector adenovírico o un vector retrovírico. En algunas realizaciones, el vector es un vector lentivírico.

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

En otro aspecto, la presente invención proporciona una célula diseñada que comprende un receptor de antígeno quimérico de la invención. En algunos casos, la célula diseñada es una célula inmunitaria. En algunos casos, la célula inmunitaria es una célula inmunoeffectora. En algunos casos, la célula inmunoeffectora es un linfocito T. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T inflamatorio, un linfocito T citotóxico, un linfocito T regulador o un linfocito T auxiliar. En algunas realizaciones, la célula diseñada es un linfocito T citotóxico CD8+.

20 En algunos casos, las células diseñadas de la presente invención son para su uso en el tratamiento de un cáncer que expresa BCMA. En algunos casos, el cáncer que expresa BCMA es mieloma múltiple.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una célula T humana diseñada que comprende un receptor de antígeno quimérico de la invención.

25 En algunas realizaciones, el dominio scFv comprende un par de secuencias de aminoácidos de LCVR/HCVR que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 58/50. En algunos casos, la región bisagra comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97. En algunos casos, el dominio transmembrana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98. En algunos casos, el dominio coestimulador 4-1BB comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 99. En algunos casos, el dominio de señalización CD3zeta comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 100.

En algunos aspectos de la divulgación, la célula T humana diseñada comprende un receptor de antígeno quimérico que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 82. En algunos aspectos de la divulgación, la célula T humana diseñada comprende un receptor de antígeno quimérico que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84. En algunos aspectos de la divulgación, la célula T humana diseñada comprende un receptor de antígeno quimérico que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 86. En algunas realizaciones, la célula T humana diseñada comprende un receptor de antígeno quimérico que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 88. En algunos aspectos de la divulgación, la célula T humana diseñada comprende un receptor de antígeno quimérico que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 90.

40 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 de antígeno quimérico de la invención. En algunos casos, la composición farmacéutica es para su uso en el tratamiento de un cáncer que expresa BCMA. En algunas realizaciones, el cáncer que expresa BCMA es mieloma múltiple.

50 En otro aspecto, la presente invención proporciona una célula diseñada como se define en las reivindicaciones. En algunos casos, la composición farmacéutica es para su uso en el tratamiento de un cáncer que expresa BCMA. En algunas realizaciones, el cáncer que expresa BCMA es mieloma múltiple.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona el uso de un receptor de antígeno quimérico, una molécula de ácido nucleico, un vector, una célula, o una célula diseñada como se indicó anteriormente o en el presente documento, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer que expresa BCMA. En algunos casos, el cáncer que expresa BCMA es mieloma múltiple. En diversas realizaciones, los receptores de antígenos quiméricos, las moléculas de ácido nucleico, los vectores, las células, o las células diseñadas de la invención se contemplan para su uso en cualquiera de los métodos indicados anteriormente o en el presente documento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los CAR o las células diseñadas que se indican en el presente documento son para su uso en medicina o para su uso en el tratamiento del cáncer como se ha indicado anteriormente o en el presente documento.

60 En otro aspecto, la presente divulgación 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 de antígeno quimérico como se indicó anteriormente o en el presente documento.

65 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar a un sujeto que padece cáncer que comprende, introducir en el sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un linfocito T que comprende un receptor de antígeno quimérico como se indicó anteriormente o en el presente documento.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para estimular una respuesta inmunitaria mediada por células T a una población de células o tejido diana en un sujeto que comprende, administrar al sujeto una cantidad eficaz de una célula modificada genéticamente para expresar un receptor de antígeno quimérico como se indicó anteriormente o en el presente documento.

5 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para proporcionar inmunidad antitumoral en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de una célula modificada genéticamente para expresar un receptor de antígeno quimérico como se indicó anteriormente o en el presente documento.

10 En algunas realizaciones de los métodos, el sujeto es un ser 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 realizaciones, el sujeto padece mieloma múltiple.

15 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de diseño de una población de células que expresen un receptor de antígeno 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 codifique un receptor de antígeno quimérico de la invención; (c) cultivar las células inmunitarias en condiciones que expresen las moléculas de ácido nucleico; y (d) aislar las células inmunitarias que expresen el receptor de antígeno 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.

20 En otro aspecto, la presente invención se refiere al receptor de antígeno quimérico de la invención para su uso en un método de tratamiento de un cáncer que exprese BCMA en un sujeto, en el que el método comprende: (a) diseñar una población de células de acuerdo con el método indicado anteriormente; y (b) reintroducir en el sujeto la población de células inmunitarias que expresen los receptores de antígenos quiméricos. En algunas realizaciones, el cáncer que expresa BCMA es mieloma múltiple.

25 Otros aspectos resultarán evidentes tras la revisión de la descripción detallada adjunta.

30 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 ilustra una construcción de nucleótidos ilustrativa para expresar una construcción de receptor de antígeno 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 de 4-1BB, un dominio de señalización CD3zeta y una secuencia IRES:eGFP para rastrear células transducidas con CAR.

Descripción detallada

40 De nuevo, la invención se define en las reivindicaciones. Todos los aspectos, realizaciones y ejemplos de la presente divulgación que no entren en el alcance de las reivindicaciones adjuntas, no forman parte de la invención y se proporcionan únicamente a título ilustrativo.

45 A menos que se definan de otro modo, todas las expresiones/términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento, tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente", cuando se utiliza en referencia a un valor numérico indicado particular, significa que el valor puede variar con respecto al valor indicado en no más de un 1 %. Por ejemplo, como se usa en el presente documento, la expresión "aproximadamente 100" incluye 99 y 101, y todos los valores intermedios (por ejemplo, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, etc.).

50 Aunque en la práctica o ensayo de la presente invención puede utilizarse cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a los que se describen en el presente documento, a continuación, se describen los métodos y materiales preferidos.

55 **Definiciones**

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

65 Como se usa en el presente documento, "un anticuerpo que se une a BCMA" o un "anticuerpo anti-BCMA" incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que reconocen específicamente a BCMA.

Las expresiones "dominio de unión a ligando" y "dominio de unión a antígeno" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a esa parte de un receptor de antígeno quimérico o de 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 proceden las CDR o regiones variables (HCVR y LCVR) utilizadas en un receptor de antígeno quimérico. Por ejemplo, las construcciones de receptores de antígenos quiméricos indicadas en el Ejemplo 2 incluyen los scFv con regiones variables procedentes de anticuerpos anti-BCMA específicos. Estos anticuerpos anti-BCMA son los "anticuerpos correspondientes" a los respectivos receptores de antígenos quiméricos.

El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, significa cualquier molécula o complejo molecular de unión a antígeno que comprende al menos una región determinante de complementariedad (CDR) que se une específicamente a, o interacciona con, un antígeno particular (por ejemplo, BCMA). El término "anticuerpo" incluye moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, así como multímeros de las mismas (por ejemplo, IgM). El término "anticuerpo" también incluye moléculas de inmunoglobulina que constan de cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como HCVR o V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como LCVR o V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de 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 que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V_H y V_L comprende tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. En distintas realizaciones de la invención, las FR del anticuerpo anti-BCMA (o parte de unión a antígeno del mismo) pueden ser idénticas a las secuencias de línea germinal humana, o pueden estar modificadas de forma natural o artificial. Una secuencia de aminoácidos consenso puede definirse basándose en un análisis en paralelo de dos o más CDR.

El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, también incluye fragmentos de unión a antígeno de moléculas de anticuerpo completas. Las expresiones "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo, "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo y similares, como se usan en el presente documento, incluyen cualquier polipéptido o glucoproteína de origen natural, que pueda obtenerse enzimáticamente, sintético o genomanipulado, que se una específicamente a un antígeno para formar un complejo. Pueden obtenerse fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo, por ejemplo, de moléculas de anticuerpo completas, mediante cualquier técnica convencional adecuada, tal como digestión proteolítica o técnicas recombinantes de ingeniería genética que implican la manipulación y expresión de ADN que codifica los dominios variables y, opcionalmente, los constantes, de un anticuerpo. Dicho ADN se conoce y/o se puede adquirir fácilmente, por ejemplo, de fuentes comerciales, de bibliotecas de ADN (incluidas, por ejemplo, fagotecas de anticuerpos) o puede sintetizarse. El ADN puede secuenciarse y manipularse químicamente o mediante técnicas de biología molecular, por ejemplo, para disponer uno o más dominios variables y/o constantes en una configuración adecuada, o para introducir codones, crear restos de cisteína, modificar, añadir o eliminar aminoácidos, etc.

Como ejemplos no limitativos de fragmentos de unión a antígeno se 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 mínimas de reconocimiento que consisten en los restos de aminoácido que imitan la región hipervariable de un anticuerpo (por ejemplo, una región determinante de complementariedad (CDR) aislada tal como un péptido CDR3), o un péptido restringido FR3-CDR3-FR4. Otras moléculas diseñadas, tales como anticuerpos específicos de dominio, anticuerpos de un solo dominio, anticuerpos con dominio eliminado, anticuerpos quiméricos, anticuerpos injertados con CDR, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos, nanocuerpos (por ejemplo, nanocuerpos monovalentes, nanocuerpos bivalentes, etc.), agentes inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP, siglas del inglés) y dominios IgNAR variables de tiburón, también se incluyen dentro de la expresión "fragmento de unión a antígeno", como se utiliza en el presente documento.

Un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo normalmente comprenderá al menos un dominio variable. El dominio variable puede tener cualquier tamaño o composición de aminoácidos y generalmente comprenderá al menos una CDR que esté adyacente a, o en fase con, una o más secuencias marco. En fragmentos de unión a antígeno que tienen un dominio V_H asociado con un dominio V_L , los dominios V_H y V_L pueden situarse uno con respecto al otro en cualquier disposición adecuada. Por ejemplo, la región variable puede ser dimérica y contener los dímeros V_H - V_H , V_H - V_L o V_L - V_L . Como alternativa, el fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede contener un dominio V_H o V_L monomérico.

En determinadas ocasiones, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede contener al menos un dominio variable unido de manera covalente a al menos un dominio constante. Como configuraciones ilustrativas, no limitativas, de dominios variables y constantes que pueden encontrarse dentro de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente divulgación se 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, incluidas cualquiera de las configuraciones ilustrativas enumeradas anteriormente, los dominios variables y constantes pueden estar unidos directamente entre sí o pueden estar unidos mediante una región bisagra o enlazadora completa o parcial. Una región bisagra puede consistir en al menos 2 (por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 40, 60 o más) aminoácidos que producen una unión flexible o semiflexible entre dominios variables y/o constantes adyacentes en una única molécula polipeptídica. Por otra parte, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente divulgación puede comprender un homodímero o heterodímero (u otro multímero) de cualquiera de las configuraciones de dominio variable y constante enumeradas anteriormente en asociación no covalente entre sí y/o con uno o más dominios V_H o V_L monoméricos (por ejemplo, mediante un enlace (o enlaces) disulfuro).

En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-BCMA son anticuerpos humanos. La expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes procedentes de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR y, en particular, en la CDR3. Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que secuencias de CDR procedentes de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias marco humanas.

En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden ser anticuerpos humanos recombinantes. La expresión "anticuerpo humano recombinante", como se usa en el presente documento, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula hospedadora (que se describe con más detalle más adelante), anticuerpos aislados de una biblioteca recombinante, combinatoria, de anticuerpos humanos (que se describe con más detalle más adelante), anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, Taylor *et al.* (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295) o anticuerpos preparados, expresan, creados o aislados mediante cualquier otro medio que implique el corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes procedentes de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En determinadas realizaciones, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se utiliza un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y, por tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque proceden de secuencias de V_H y V_L de la línea germinal humana, y están relacionadas con ella, no pueden existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

Los anticuerpos humanos pueden existir en dos formas que se asocian a la heterogeneidad de bisagra. En una forma, una molécula de inmunoglobulina comprende una construcción de cuatro cadenas estable de aproximadamente 150-160 kDa en donde los dímeros se mantienen juntos mediante un enlace disulfuro intercatenario de la cadena pesada. En una segunda forma, los dímeros no están unidos a través de enlaces disulfuro intercatenarios y se forma una molécula de aproximadamente 75-80 kDa compuesta por una cadena ligera y pesada acopladas covalentemente (semianticuerpo). Estas formas han sido extremadamente difíciles de separar, incluso después de la purificación por afinidad.

La frecuencia de aparición de la segunda forma en diferentes isotipos de IgG inalterada se debe, aunque no de forma limitativa, a diferencias estructurales asociadas al isotipo de la región bisagra del anticuerpo. Una sustitución de un solo aminoácido en la región bisagra de la bisagra de la IgG4 humana puede reducir significativamente la aparición de la segunda forma (Angal *et al.* (1993) Molecular Immunology 30:105) hasta los niveles normalmente observados usando una bisagra de IgG1 humana. La presente divulgación abarca anticuerpos que tienen una o más mutaciones en la región bisagra, la región C_H2 o C_H3, que puede ser deseable, por ejemplo, en la producción, para mejorar el rendimiento de la forma de anticuerpo deseada.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos aislados. Un "anticuerpo aislado", como se usa en el presente documento, significa un anticuerpo que se ha identificado y separado y/o recuperado de al menos un componente de su entorno natural. Por ejemplo, un anticuerpo que se ha separado o eliminado de al menos un componente de un organismo, o de un tejido o célula en donde el anticuerpo existe de forma natural o se produce de forma natural, es un "anticuerpo aislado" para los fines de la presente invención. Un anticuerpo aislado también incluye un anticuerpo *in situ* dentro de una célula recombinante. Los anticuerpos aislados son anticuerpos que se han sometido a al menos una etapa de purificación o aislamiento. De acuerdo con determinadas realizaciones, un anticuerpo aislado puede carecer sustancialmente de otro material celular y/o agentes químicos.

Los anticuerpos anti-BCMA desvelados en el presente documento pueden comprender una o más sustituciones, inserciones y/o eliminaciones en las regiones marco y/o CDR de los dominios variables de cadena pesada y ligera en comparación con las secuencias de la línea germinal correspondientes de las que proceden los anticuerpos. Dichas mutaciones pueden determinarse fácilmente comparando las secuencias de aminoácidos desveladas en el presente documento con secuencias de la línea germinal disponibles, por ejemplo, en bases de datos públicas de secuencias

de anticuerpos. La presente divulgación incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que proceden de cualquiera de las secuencias de aminoácidos desveladas en el presente documento, en donde uno o más aminoácidos dentro de una o más regiones marco y/o CDR están mutados en el resto o restos correspondientes de la secuencia de la línea germinal de la que procede el anticuerpo, o en el resto o restos correspondientes de otra secuencia de la línea germinal humana, o en una sustitución de aminoácidos conservativa del resto o restos de la línea germinal correspondientes (dichos cambios de secuencia se denominan en conjunto en el presente documento "mutaciones de la línea germinal"). Un experto en la materia, partiendo de las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera desveladas en el presente documento, puede producir fácilmente numerosos anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que comprendan una o más mutaciones individuales de la línea germinal o combinaciones de las mismas. En determinadas ocasiones, todos los restos de la región marco y/o CDR dentro de los dominios V_H y/o V_L retromutan a los restos encontrados en la secuencia de la línea germinal original de la que se obtuvo el anticuerpo. En otras ocasiones, únicamente determinados restos retromutan a la secuencia de línea germinal original, por ejemplo, únicamente los restos mutados encontrados dentro de los 8 primeros aminoácidos de FR1 o dentro de los 8 últimos aminoácidos de FR4, o únicamente los restos mutados encontrados dentro de CDR1, CDR2 o CDR3. En otras ocasiones, uno o más del resto o restos marco y/o CDR están mutados en el resto o restos 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 se obtuvo originalmente el anticuerpo). Asimismo, los anticuerpos de la presente divulgación pueden contener cualquier combinación de dos o más mutaciones de la línea germinal dentro de las regiones marco conservadas y/o las CDR, por ejemplo, en donde determinados restos individuales mutan al resto correspondiente de una secuencia de la línea germinal particular, mientras que otros restos determinados, que difieren de los de la secuencia de la línea germinal original, se mantienen o mutan al resto correspondiente de una secuencia de línea germinal distinta. Una vez obtenidos, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que contienen una o más mutaciones de la línea germinal pueden probarse fácilmente con respecto a una o más propiedades deseadas tales como, especificidad de unión mejorada, mayor afinidad de unión, propiedades biológicas antagonistas o agonistas mejoradas o potenciadas (según sea el caso), inmunogenicidad reducida, etc. Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno obtenidos de esta manera general están abarcados en la presente divulgación.

Los anticuerpos anti-BCMA pueden comprender variantes de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las HCVR, LCVR y/o CDR desveladas en el presente documento que tienen una o más sustituciones conservativas. Por ejemplo, los anticuerpos anti-BCMA pueden tener secuencias de aminoácidos de las HCVR, LCVR y/o CDR, por ejemplo, con 10 o menos, 8 o menos, 6 o menos, 4 o menos, etc., sustituciones de aminoácidos conservativas respecto a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las HCVR, LCVR y/o CDR expuestas en el presente documento.

El término "epítipo" se refiere a un determinante antigénico que interactúa con un sitio de unión a antígeno específico en la región variable de una molécula de anticuerpo conocida como parátipo. Un único antígeno puede tener más de un epítipo. Por tanto, distintos anticuerpos pueden unirse a distintas áreas de un antígeno y pueden tener distintos efectos biológicos. Los epítipos pueden ser conformacionales o lineales. Un epítipo conformacional se produce mediante aminoácidos yuxtapuestos espacialmente de diferentes segmentos de la cadena polipeptídica lineal. Un epítipo lineal es uno producido por restos de aminoácidos adyacentes en una cadena polipeptídica. En una determinada circunstancia, un epítipo puede incluir fracciones de sacáridos, grupos fosforilo o grupos sulfonilo en el antígeno.

La expresión "identidad sustancial" o "sustancialmente idéntico", cuando hace referencia a un ácido nucleico o fragmento del mismo, indica que, cuando se alinean de forma óptima con inserciones o eliminaciones de nucleótidos adecuadas con otro ácido nucleico (o su cadena complementaria), existe identidad de secuencia de nucleótidos en al menos aproximadamente un 95 % y, más preferentemente, en al menos aproximadamente un 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de las bases nucleotídicas, según se mide mediante cualquier algoritmo bien conocido de identidad de secuencia, tal como FASTA, BLAST o Gap, como se analiza a continuación. Una molécula de ácido nucleico que tiene una identidad sustancial con una molécula de ácido nucleico de referencia puede, en determinadas ocasiones, codificar un polipéptido que tenga la misma secuencia de aminoácidos o una sustancialmente similar que el polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de referencia.

Aplicada a polipéptidos, la expresión "similitud sustancial" o "sustancialmente similar" significa que cuando dos secuencias peptídicas se alinean de forma óptima, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT utilizando ponderaciones de hueco predeterminadas, comparten al menos un 95 % de identidad de secuencia, incluso más preferentemente al menos un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia. Preferentemente, las posiciones de los restos que no son idénticas difieren en sustituciones de aminoácidos conservativas. Una "sustitución de aminoácido conservativa" es aquella en la que un resto de aminoácido se sustituye por otro resto de aminoácido que tiene una cadena lateral (grupo R) con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución de aminoácido conservativa no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En los casos en que dos o más secuencias de aminoácidos difieren entre sí en sustituciones conservativas, el porcentaje de identidad de secuencia o grado de similitud puede ajustarse al alza para corregir la naturaleza conservativa de la sustitución. Los medios para hacer este ajuste son bien conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331. 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 de hidroxilo-alifáticas: 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 que son cisteína y metionina. Son grupos de sustitución conservativa de aminoácidos preferidos: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato y asparagina-glutamina. Como alternativa, un remplazo conservativo es cualquier cambio que tenga un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250 desvelada en Gonnet *et al.* (1992) Science 256: 1443-1445. Un remplazo "moderadamente conservativo" es cualquier cambio que tiene un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250.

La similitud de secuencia para polipéptidos, que también se denomina identidad de secuencia, se mide normalmente con un programa informático de análisis de secuencias. El programa informático de análisis de proteínas empareja secuencias similares usando medidas de similitud asignadas a diferentes sustituciones, eliminaciones y otras modificaciones, incluyendo sustituciones conservativas de aminoácidos. Por ejemplo, el programa informático GCG contiene programas tales como Gap y Bestfit, que pueden utilizarse con los parámetros por defecto para determinar la homología de secuencia o la identidad de secuencia entre polipéptidos estrechamente relacionados, tales como polipéptidos homólogos de distintas especies de organismos o entre una proteína de tipo natural y una muteína de la misma. Véase, por ejemplo, GCG Versión 6.1. Las secuencias polipeptídicas también pueden compararse con FASTA usando parámetros por defecto o recomendados, un programa en GCG Versión 6.1. FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) proporciona alineamientos y porcentajes de identidad de secuencia de las regiones del mejor solapamiento entre las secuencias de consulta y de búsqueda (Pearson (2000) citado anteriormente). Otro algoritmo preferente al comparar una secuencia de la divulgación con una base de datos que contiene una gran cantidad de secuencias de diferentes organismos es el programa informático BLAST, especialmente BLASTP o TBLASTN, usando parámetros por defecto. Véase, por ejemplo, Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 y Altschul *et al.* (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-402.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "ácido nucleico" o "polinucleótidos" se refieren a nucleótidos y/o polinucleótidos, tal como ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), oligonucleótidos, fragmentos generados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y fragmentos generados por cualquiera de ligamiento, escisión, acción de endonucleasa y acción de exonucleasa. Las moléculas de ácido nucleico pueden estar compuestas de monómeros que son nucleótidos naturales (como el ADN y el ARN) o análogos de nucleótidos naturales (por ejemplo, formas enantioméricas de nucleótidos naturales), o una combinación de ambas. Los nucleótidos modificados pueden tener alteraciones en restos de azúcar y/o en restos de bases de pirimidina o purina. Las modificaciones de azúcar incluyen, por ejemplo, reemplazo de uno o más grupos hidroxilo por halógenos, grupos alquilo, aminas y grupos azido, o los azúcares pueden funcionalizarse como éteres o ésteres. Por otra parte, todo el resto de azúcar puede reemplazarse por estructuras que, desde un punto de vista estérico y electrónico, son similares, tales como azúcares aza y análogos de azúcar carbocíclico. Los ejemplos de modificaciones en un resto base incluyen purinas y pirimidinas alquiladas, purinas o pirimidinas aciladas, u otros sustitutos heterocíclicos bien conocidos. Los monómeros de ácido nucleico pueden estar unidos mediante enlaces fosfodiéster o análogos de dichos enlaces. Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios.

La expresión "receptor de antígeno 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 por un antígeno deseado (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 presenta una actividad inmunitaria celular anti-diana específica. En general, los CAR consisten en un dominio de unión a anticuerpo monocatenario (scFv) extracelular fusionado al dominio de señalización intracelular de la cadena zeta del complejo del receptor de antígeno de células T, y cuando se expresan en las células T, tienen la capacidad de redirigir el reconocimiento antigénico basándose en la especificidad del anticuerpo monoclonal.

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

Un "dominio coestimulador" o una "molécula coestimuladora" se refiere al compañero de unión afín en una célula T que se une específicamente con un ligando coestimulador, mediando de este modo en una respuesta coestimuladora

por la célula, tal como, pero sin limitación, la proliferación. Las moléculas coestimuladoras incluyen, pero sin limitación, una molécula MHC de clase I, BTLA y receptor de ligando Toll. Los 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 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 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 afín en una célula T, proporcionando de este modo una señal que, además de la señal primaria proporcionada, por ejemplo, mediante la unión de un complejo de TCR/CD3 con una molécula del MHC cargada con péptido, media en una respuesta de células T, incluyendo, aunque no de forma limitativa, activación de proliferación, diferenciación y similares. Un ligando coestimulador puede incluir, pero sin limitación, 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 linfotóxina beta, 3/TR6, ILT3, ILT4, un agonista o anticuerpo que se une con el receptor de ligando Toll y un ligando que se une específicamente con B7-H3.

Una "señal coestimuladora" se refiere a una señal, que, junto con una señal primaria, tal como un ligamiento TCR/CD3, conduce a la proliferación de células T y/o a la regulación por aumento o por disminución de moléculas clave.

La expresión "dominio de unión a ligando extracelular" como se usa en el presente documento, se refiere a un oligopéptido o polipéptido que es capaz de unirse a un ligando, por ejemplo, a una molécula de la superficie celular. Por ejemplo, el dominio de unión a ligando extracelular puede elegirse para que reconozca a un ligando que actúe como un marcador de superficie celular en células diana a una patología particular (por ejemplo, cáncer). Como ejemplos de marcadores de superficie celular que pueden actuar como ligandos se incluyen los que están asociados a infecciones víricas, bacterianas y parasitarias, a enfermedad autoinmunitaria y a células cancerosas.

El término "sujeto" o "paciente", como se usa en el presente documento, incluye todos los miembros del reino animal, incluidos los primates no humanos y los seres humanos. En una realización, los pacientes son seres humanos con un cáncer (por ejemplo, mieloma múltiple).

Un "dominio de transducción de señales" o "dominio de señalización" de un CAR, como se usa en el presente documento, es responsable de la señalización intracelular después de la unión de un dominio de unión a ligando extracelular con la diana, lo que da como resultado la activación de la célula inmunitaria y de la respuesta inmunitaria. Dicho de otro modo, el dominio de transducción de señal es responsable de la activación o inactivación 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 actividad auxiliar incluyendo la secreción de citocinas. Por tanto, la expresión "dominio de transducción de señal" se refiere a la parte de una proteína que transduce la señal efectora a señal funcional y dirige la célula para realizar una función especializada. Los ejemplos de dominios de transducción de señal para su uso en un CAR pueden ser las secuencias citoplasmáticas del receptor y correceptores de células T que actúan en sintonía para iniciar la transducción de señal después de la interacción con el receptor antigénico, así como cualquier derivado o variante de estas secuencias y cualquier secuencia sintética que tenga 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 de antígeno y las que actúan de una manera dependiente de antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora. Las secuencias de señalización citoplasmática primaria pueden comprender motivos de señalización que se conocen como motivos de activación inmunorreceptores basados en tirosina o ITAM (por las siglas del inglés). Los ITAM son motivos de señalización bien definidos hallados en la cola intracitoplasmática de una diversidad de receptores que actúan como sitios de unión para tirosina cinasas de clase syk/zap70. Como ITAM ilustrativos se incluyen los que proceden de TCRzeta, FcRgamma, FcRbeta, FcRépsilon, CD3gamma, CD3delta, CD3épsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. En algunas realizaciones, el dominio transductor de señales del CAR puede comprender el dominio de señalización CD3zeta (SEQ ID NO: 100).

Receptores de antígenos quiméricos (CAR)

Los receptores de antígenos quiméricos (CAR) redirigen la especificidad de las células T hacia antígenos reconocidos por anticuerpos expresados en la superficie de las células (por ejemplo, células de cáncer), mientras que los receptores de células T (TCR) amplían la gama de dianas para incluir antígenos intracelulares (por ejemplo, antígenos tumorales).

Un aspecto de la presente invención incluye un receptor de antígeno quimérico (CAR) que es específico para un antígeno de maduración de células B (BCMA) expresado en la superficie de células plasmáticas neoplásicas. En la invención, el CAR comprende un dominio de unión extracelular específico de la diana, un dominio transmembrana, un dominio de señalización intracelular (procedente de CD3zeta) y uno o más dominios de señalización coestimuladores procedentes de una molécula coestimuladora (4-1BB). En una realización, el CAR incluye una región bisagra o 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. De acuerdo con la divulgación, un dominio de unión (por ejemplo, un dominio de unión a ligando o un dominio de unión a antígeno) puede ser cualquier proteína, polipéptido, oligopéptido o péptido que posea la capacidad de reconocer y unirse específicamente a una molécula biológica (por ejemplo, un receptor de superficie celular o una proteína tumoral o uno de sus componentes). Un dominio de unión para una molécula biológica de interés incluye cualquier compañero de unión de origen natural, sintético, semisintético o producido de forma recombinante. Por ejemplo, y como se describe adicionalmente en el presente documento, un dominio de unión puede ser las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada de un 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). Para identificar dominios de unión de la presente divulgación que se unan específicamente con una diana particular se conocen diversos ensayos, entre los que se incluyen transferencia Western, ELISA, citometría de flujo o análisis de resonancia de plasmón superficial (por ejemplo, utilizando análisis BIACORE). La diana puede ser un antígeno de interés clínico contra el cual sería deseable desencadenar una respuesta inmunoefectora que dé como resultado la destrucción del tumor. En la invención, el antígeno diana del dominio de unión del receptor de antígeno quimérico es una proteína BCMA en la superficie de las células tumorales, en particular, células tumorales de linaje de células B, tales como células de mieloma múltiple.

Como dominios de unión a ligando ilustrativos se incluyen proteínas de unión a antígeno, tales como fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo, tal como scFv, scTCR, dominios extracelulares de receptores, ligandos para moléculas/receptores de la superficie celular, o dominios de unión a receptores de los mismos, y proteínas de unión a tumores. En determinadas ocasiones, los dominios de unión a antígeno incluidos en un CAR de la divulgación pueden ser una región variable (Fv), un CDR, un Fab, un scFv, un VH, un VL, una variante de anticuerpo de dominio (dAb), un anticuerpo de camélido (VHH), una variante del dominio 3 de fibronectina, una variante repetida de anquirina y otro dominio de unión específico de antígeno procedente de otras estructuras de proteínas. En la invención, el dominio de unión es un scFv.

En un aspecto de la divulgación, el dominio de unión del CAR es un anticuerpo monocatenario (scFv) anti-BCMA y puede ser un scFv murino, humano o humanizado. Se pueden clonar anticuerpos monocatenarios a partir de los genes de la región V de un hibridoma específico para una diana deseada. 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 *et al.*, PNAS, 1989; 86: 3833-3837. Por tanto, en ciertos aspectos de la divulgación, un dominio de unión comprende un dominio de unión procedente de un anticuerpo, pero puede ser un dominio de unión no procedente de un anticuerpo. Un dominio de unión procedente de un anticuerpo puede ser un fragmento de un anticuerpo o un producto genomanipulado de uno o más fragmentos del anticuerpo, cuyo fragmento participe en la unión con el antígeno.

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

En determinadas realizaciones, los enlazadores adecuados para su uso en el CAR descrito en el presente documento son enlazadores flexibles. Los enlazadores adecuados pueden seleccionarse fácilmente y pueden tener una longitud cualquiera que sea adecuada, tal como de 1 aminoácido (por ejemplo, Gly) a 20 aminoácidos, de 2 aminoácidos a 15 aminoácidos, de 3 aminoácidos a 12 aminoácidos, incluyendo de 4 aminoácidos a 10 aminoácidos, de 5 aminoácidos a 9 aminoácidos, de 6 aminoácidos a 8 aminoácidos o de 7 aminoácidos a 8 aminoácidos, y pueden tener 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 aminoácidos.

Los enlazadores flexibles ilustrativos incluyen polímeros de glicina (G)_n, polímeros de glicina-serina, siendo n 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 de glicina-serina están relativamente desestructurados y, por lo tanto, pueden servir como una unión neutra entre dominios de proteínas de fusión, tales como los CAR descritos en el presente documento. La glicina tiene acceso a un espacio phi-psi significativamente mayor incluso que la alanina y está menos restringida que los restos con cadenas laterales más largas (véase Sheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992)). El experto familiarizado con la técnica reconocerá que el diseño de un CAR puede incluir enlazadores que sean total o parcialmente flexibles, de tal forma que el enlazador pueda incluir un enlazador flexible, así como una o más porciones que confieran una estructura menos flexible para proporcionar una estructura de CAR deseada. Como enlazadores específicos se incluyen enlazadores (G4S)_n, en donde n=1-3, como se muestra en las SEQ ID NO: 95-97, así como el enlazador mostrado en la SEQ ID NO: 96.

El dominio de unión del CAR puede ir seguido de un "espaciador" o de una "bisagra", que se refieren a la región que aleja el dominio de unión a antígeno de la superficie de la célula efectora para permitir el contacto célula/célula, la

unión y activación de antígenos adecuados (Patel *et al.*, Gene Therapy, 1999; 6: 412-419). La región bisagra en un CAR se encuentra generalmente entre el dominio transmembrana (TM) y el dominio de unión. En determinadas ocasiones, una región bisagra es una región bisagra de inmunoglobulina y puede ser una región bisagra de inmunoglobulina de tipo natural o una región bisagra de inmunoglobulina de tipo natural alterada. Otras regiones bisagra ilustrativas utilizadas en los CAR descritos en el presente documento incluyen la región bisagra procedente de las regiones extracelulares de proteínas de membrana tipo 1 tales como CD8alfa, CD4, CD28 y CD7, que pueden ser regiones bisagra de tipo natural de estas moléculas o pueden estar alteradas. En una realización, la región bisagra comprende una bisagra CD8alfa (SEQ ID NO: 97).

La región o dominio "transmembrana" es la parte del CAR que ancla la parte de unión extracelular a la membrana plasmática de la célula inmunoefectora y facilita la unión del dominio de unión con el antígeno diana. El dominio transmembrana puede ser un dominio transmembrana CD3zeta, sin embargo, otros dominios transmembrana que pueden emplearse incluyen los obtenidos de CD8alfa, CD4, CD28, CD45, CD9, CD16, CD22, CD33, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 y CD154. Por ejemplo, el dominio transmembrana es el dominio transmembrana de CD137. En algunas realizaciones, el dominio transmembrana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98. En determinadas ocasiones, el dominio transmembrana es sintético, en cuyo caso comprendería restos predominantemente hidrófobos tales como leucina y valina.

El "dominio de señalización intracelular" o "dominio de señalización" se refiere a la parte de la proteína receptora de antígeno quimérico que participa en la transducción del mensaje de unión eficaz de CAR a un antígeno diana en el interior de la célula inmunoefectora para provocar la función de la célula efectora, por ejemplo, la activación, la producción de citocinas, la proliferación y la actividad citotóxica, incluida la liberación de factores citotóxicos a la célula diana unida a CAR, u otras respuestas celulares provocadas con la unión del antígeno al dominio del CAR extracelular. La expresión "función efectora" se refiere a una función especializada de la célula. La función efectora de la célula T, por ejemplo, puede ser una actividad citolítica o auxiliar o una actividad que incluya la secreción de una citocina. Por tanto, las expresiones "dominio de señalización intracelular" o "dominio de señalización", utilizadas indistintamente en el presente documento, se refieren a la parte de una proteína que transduce la señal de función efectora y que dirige a la célula para realizar una función especializada. Aunque normalmente se puede emplear todo el dominio de señalización intracelular, en muchos casos no es necesario usar todo el dominio. En la medida en que se use una parte truncada de un dominio de señalización intracelular, dicha parte truncada puede usarse en lugar del dominio completo siempre que transduzca la señal de la función efectora. La expresión dominio de señalización intracelular pretende incluir cualquier parte truncada del dominio de señalización intracelular, que es suficiente para transducir la señal de la función efectora. El dominio de señalización intracelular también se conoce como, "dominio de transducción de señales", y normalmente procede de partes de las cadenas CD3 o FcRy humanas.

Se sabe que las señales generadas a través del receptor de células T por sí solas son insuficientes para la activación completa de las células T y que también se requiere una señal secundaria o coestimuladora. Por tanto, se puede decir 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 de antígeno a través del receptor de células T (secuencias de señalización citoplasmática primaria) y las que actúan de forma 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 inmunorreceptores basados en tirosina o ITAM.

Como ejemplos de ITAM que contienen secuencias de señalización citoplasmática primaria que son de uso particular en la divulgación, se incluyen los que proceden de TCRzeta, FcRgamma, FcRbeta, CD3gamma, CD3delta, CD3epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. En la invención, el dominio de señalización intracelular de los CAR anti-BCMA de la invención proceden de CD3zeta. En algunas realizaciones, el dominio de señalización comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 100.

Como se usa en el presente documento, la expresión, "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 de antígenos o receptores de Fc que proporcionan una segunda señal necesaria para la activación y función eficaces de los linfocitos T tras su unión al antígeno. Como ejemplos de dichas moléculas coestimuladoras se 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. En consecuencia, aunque la presente divulgación proporciona dominios coestimuladores ilustrativos procedentes de CD3zeta y 4-1BB, se contemplan otros dominios coestimuladores para su uso con los CAR descritos en el presente documento. 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 coestimuladores pueden unirse en cualquier orden en tándem con el extremo carboxilo del dominio transmembrana. En algunas realizaciones, el dominio coestimulador comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 99.

Aunque se ha demostrado que los CAR basados en scFv diseñados para contener un dominio de señalización de CD3 o FcRgamma suministran una señal fuerte para la activación de las células T y la función efectora, no son suficientes

para provocar 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 procedente de CD3zeta o FcRgamma junto con uno o más dominios de señalización coestimuladores (por ejemplo, dominios coestimuladores intracelulares procedentes de CD28, CD137, CD134 y CD278) pueden dirigir más eficazmente la actividad antitumoral así como el aumento de la 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 *et al.*, Molecular Therapy, 2009; 17: 1453-1464; Zhong *et al.*, Molecular Therapy, 2010; 18: 413-420; Carpenito *et al.*, PNAS, 2009; 106:3360-3365).

En diversos aspectos, los CAR específicos de BCMA de la divulgación comprenden (a) un scFv anti-BCMA como dominio de unión (por ejemplo, un scFv que tiene regiones de unión (por ejemplo, las CDR o los dominios variables) de uno cualquiera o más de los anticuerpos de BCMA identificados en la Tabla 1) (b) una región bisagra procedente de CD8alfa humano, (c) un dominio transmembrana CD8alfa humano y (d) un dominio de señalización intracelular (CD3) de la cadena zeta de CD3 del receptor humano de células T, y opcionalmente uno o más dominios de señalización coestimuladores, por ejemplo, 4-1BB. Por ejemplo, los diferentes dominios de proteína están ordenados desde el extremo amino al carboxilo en el siguiente orden: dominio de unión, región bisagra y dominio transmembrana. El dominio de señalización intracelular y los dominios de señalización coestimuladores opcionales están unidos al extremo carboxilo transmembrana en cualquier orden en tándem para formar un polipéptido quimérico monocatenario. Por ejemplo, una construcción de ácido nucleico que codifica un CAR de BCMA es una molécula de ácido nucleico quimérica que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende diferentes secuencias codificantes, por ejemplo, (de 5' a 3') las secuencias codificantes de un scFv anti-BCMA humano, una bisagra CD8alfa humana, un dominio transmembrana CD8alfa humano y un dominio de señalización intracelular CD3zeta. En otro ejemplo, una construcción de ácido nucleico que codifica un CAR de BCMA es una molécula de ácido nucleico quimérica que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende diferentes secuencias codificantes, por ejemplo, (de 5' a 3') las secuencias codificantes de un scFv anti-BCMA humano, una bisagra CD8alfa humana, un dominio transmembrana CD8 alfa humano, un dominio coestimulador 4-1BB y un dominio coestimulador CD3zeta.

En determinadas realizaciones, el polinucleótido que codifica el CAR de la invención se inserta en un vector. El vector es un vehículo en el que se puede insertar de manera covalente un polinucleótido que codifica una proteína para provocar la expresión de esa proteína y/o la clonación del polinucleótido. Dichos vectores también pueden denominarse "vectores de expresión". El polinucleótido aislado se puede insertar en un vector usando cualquier método adecuado conocido en la técnica, por ejemplo, sin limitación, el vector se puede digerir usando enzimas de restricción apropiadas y después se puede ligar con el polinucleótido aislado que tiene extremos de restricción coincidentes. Los vectores de expresión tienen la capacidad de incorporar y expresar secuencias de ácidos nucleicos 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 se traducen después en una proteína. Los vectores de expresión pueden contener una diversidad de secuencias de control, que se refieren a secuencias de un ácido nucleico necesarias para la transcripción y posiblemente la traducción de una secuencia codificante unida operativamente en un determinado organismo hospedador. Además de las secuencias de control que rigen la transcripción y la traducción, los vectores y los vectores de expresión pueden contener secuencias de ácido nucleico que cumplen también otras funciones y que se analizan 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 hospedador procariota para la clonación y amplificación.

El vector de expresión puede tener los elementos reguladores cadena arriba en sentido 5' y cadena abajo en sentido 3' necesarios, tales como secuencias promotoras, tales como los promotores de CMV, PGK y EF1alfa, la secuencia TATA de unión y reconocimiento de ribosomas y la secuencia de terminación de la transcripción AAUAAA en la UTR (región no traducida) 3' para una transcripción y traducción génicas eficaces en su respectiva célula hospedadora. Otros promotores adecuados incluyen el promotor constitutivo del promotor temprano del virus simio 40 (SV40), del virus de tumor mamario de ratón (MMTV), promotor de LTR del VIH, el promotor del MoMuLV, el promotor del virus de la leucemia aviar, el promotor temprano inmediato del VEB y el promotor del virus del sarcoma de Rouss. También pueden usarse promotores de genes humanos, incluyendo, pero sin limitación, el promotor de actina, el promotor de miosina, el promotor de hemoglobina y el promotor de creatina cinasa. En determinadas realizaciones también se contemplan promotores inducibles como parte de los vectores que expresan el receptor de antígeno quimérico. Esto proporciona un interruptor molecular capaz de activar o desactivar la expresión de la secuencia de polinucleótidos de interés. Los ejemplos de promotores inducibles incluyen, pero sin limitación, 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 una etiqueta de 6x-histidina, c-Myc y FLAG que se incorpora a los CAR expresados. Por tanto, el vector de expresión puede diseñarse para que contenga secuencias reguladoras no traducidas en posición 5' y 3' que a veces pueden actuar como secuencias potenciadoras, regiones promotoras y/o secuencias terminadoras que pueden facilitar o mejorar la transcripción eficaz del ácido nucleico, o de los ácidos nucleicos de interés, transportado(s) en el vector de expresión. También se puede diseñar un vector de expresión para la funcionalidad de replicación y/o expresión (por ejemplo, transcripción y traducción) en un tipo de célula particular, ubicación celular o tipo de tejido. Los vectores de expresión pueden incluir un marcador de selección

para el mantenimiento del vector en la célula hospedadora o receptora.

En diversas realizaciones, los vectores son plásmidos, secuencias que se replican de forma autónoma y elementos transponibles. 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 procedente de P1 (PAC), bacteriófagos, tales como el fago lambda o el fago M13, y virus de animales. Como ejemplos de categorías de virus de animales útiles como vectores se incluyen, sin limitación, retrovirus (incluido lentivirus), adenovirus, virus adenoasociado, herpesvirus (por ejemplo, virus del herpes simple), poxvirus, baculovirus, papilomavirus y papovavirus (por ejemplo, SV40). Son ejemplos de vectores de expresión los vectores Lenti-X™ del sistema de expresión bicistrónico (Neo) (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 desveladas en el presente documento se pueden ligar en dichos vectores de expresión para la expresión de la proteína quimérica en células de mamífero.

En determinadas realizaciones, los ácidos nucleicos que codifican el CAR de la presente invención se proporcionan en un vector vírico. Un vector vírico puede ser uno que proceda de un retrovirus, lentivirus o espumavirus. Como se usa en el presente documento, la expresión, "vector vírico", se refiere a una construcción de vector de ácido nucleico que incluye al menos un elemento de origen vírico y que tiene la capacidad de empaquetarse en una partícula de vector vírica. El vector vírico puede contener la secuencia codificante de las diversas proteínas quiméricas descritas en el presente documento en lugar de genes víricos no esenciales. El vector y/o la partícula se puede utilizar con el fin de transferir ADN, ARN u otros ácidos nucleicos al interior de las células *ex-vivo* o *in vivo*. En la técnica se conocen numerosas formas de vectores víricos.

En determinadas realizaciones, el vector vírico que contiene la secuencia codificante de un CAR descrito en el presente documento es un vector retrovírico o un vector lentivírico. La expresión "vector retrovírico" se refiere a un vector que contiene elementos genéticos estructurales y funcionales que proceden principalmente de un retrovirus. La expresión "vector lentivírico" se refiere a un vector que contiene elementos genéticos estructurales y funcionales fuera de las LTR que proceden principalmente de un lentivirus.

Los vectores retrovíricos, para su uso en el presente documento, pueden proceder de cualquier retrovirus conocido (por ejemplo, retrovirus tipo c, tales como el virus del sarcoma murino de Moloney (MoMSV), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus del tumor mamario murino (MuMTV), virus de la leucemia del gibón (GaLV), virus de la leucemia felina (FLV), espumavirus, virus de Friend, virus de células madre murinas (MSCV) y virus del sarcoma de Rous (RSV)). Los "retrovirus" de la invención también incluyen virus de la leucemia de células T humanas, HTLV-1 y HTLV-2, y la familia lentivírica de retrovirus, tales como el virus de la inmunodeficiencia humana, HIV-1, HIV-2, el virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV), el virus de inmunodeficiencia felina (FIV), el virus de la inmunodeficiencia equina (EIV) y otras clases de retrovirus.

Un vector lentivírico, para su uso en el presente documento, se refiere a un vector procedente de un lentivirus, un grupo (o género) de retrovirus que da lugar a enfermedades de desarrollo lento. Los virus incluidos dentro de este grupo incluyen el HIV (virus de inmunodeficiencia humana; incluyendo HIV de tipo 1 y HIV de tipo 2); visna-maedi virus; un virus de la artritis-encefalitis caprina; virus de anemia infecciosa equina; virus de inmunodeficiencia felina (FIV); virus de inmunodeficiencia bovina (BIV); y virus de inmunodeficiencia de simios (SIV). La preparación del lentivirus recombinante puede realizarse usando los métodos según Dull *et al.* y Zufferey *et al.* (Dull *et al.*, J. Virol., 1998; 72: 8463-8471 y Zufferey *et al.*, J. Virol. 1998; 72:9873-9880).

Los vectores retrovíricos (es decir, tanto lentivíricos como no lentivíricos), para uso en la presente invención, se pueden formar usando técnicas de clonación estándar combinando las secuencias de ADN deseadas en el orden y orientación descritos en el presente documento (Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F. M. *et al.* (eds.) Greene Publishing Associates, (1989), Secciones 9.10-9.14 y en otros manuales de laboratorio convencionales; Eglitis, *et al.* (1985) Science 230:1395-1398; Danos y Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6460-6464; Wilson *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3014-3018; Armentano *et al.* (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6141-6145; Huber *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8039-8043; Ferry *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8377-8381; Chowdhury *et al.* (1991) Science 254:1802-1805; van Beusechem *et al.* (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7640-7644; Kay *et al.* (1992) Human Gene Therapy 3:641-647; Dai *et al.* (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10892-10895; Hwu *et al.* (1993) J. Immunol 150:4104-4115; patente de Estados Unidos n.º 4.868.116; patente de Estados Unidos n.º 4.980.286; solicitud PCT WO 89/07136; solicitud PCT WO 89/02468; solicitud PCT WO 89/05345; y solicitud PCT WO 92/07573).

Como fuentes adecuadas para obtener secuencias retrovíricas (es decir, tanto lentivíricas como no lentivíricas) para su uso en la formación de los vectores se incluyen, por ejemplo, ARN genómico y ADNc que se obtienen de fuentes disponibles en el comercio, incluida la Colección Americana de Cultivos Tipo (*American Type Culture Collection*, ATCC), Rockville, Md. Las secuencias también pueden sintetizarse químicamente.

Para la expresión de un CAR de BCMA, el vector puede introducirse en una célula hospedadora para permitir la

expresión del polipéptido dentro de dicha célula. Los vectores de expresión pueden contener diversos elementos para controlar la expresión, incluyendo sin limitación, secuencias promotoras, secuencias de iniciación de la transcripción, secuencias potenciadoras, marcadores de selección y secuencias señal. Un experto familiarizado con la técnica puede seleccionar estos elementos según sea apropiado, como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, las secuencias promotoras pueden seleccionarse para promover la transcripción del polinucleótido en el vector. Como secuencias promotoras adecuadas se incluyen, sin limitación, el promotor de T7, promotor de T3, promotor de SP6, promotor de beta-actina, promotor de EF1a, promotor de CMV y promotor de SV40. Para mejorar la transcripción del polinucleótido pueden seleccionarse secuencias potenciadoras. Para permitir seleccionar células hospedadoras insertadas con el vector de las que no lo están pueden seleccionarse marcadores de selección, por ejemplo, los marcadores de selección pueden ser genes que confieren resistencia a antibióticos. Para permitir que el polipéptido expresado se transporte fuera de la célula hospedadora pueden seleccionarse secuencias señal.

Para la clonación del polinucleótido, el vector puede introducirse en una célula hospedadora (una célula hospedadora aislada) para permitir la replicación del propio vector y amplificar así las copias del polinucleótido contenidas en el mismo. Los vectores de clonación pueden contener componentes de secuencia que generalmente incluyen, sin limitación, un origen de replicación, secuencias promotoras, secuencias de iniciación de la transcripción, secuencias potenciadoras y marcadores de selección. Un experto familiarizado con la técnica puede seleccionar estos elementos según sea apropiado. Por ejemplo, el origen de replicación puede seleccionarse para promover la replicación autónoma del vector en la célula hospedadora.

En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona células hospedadoras aisladas que contienen los vectores de la invención. Las células hospedadoras que contienen el vector pueden ser útiles en la expresión o clonación del polinucleótido contenido en el vector. Las células hospedadoras adecuadas pueden incluir, sin limitación, células procariotas, células fúngicas, células de levadura o células eucariotas superiores tales como células de mamífero. Para esta finalidad como células procariotas adecuadas se incluyen, sin limitación, eubacterias, tales como organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo, Enterobacteriaceae tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescens* y *Shigella*, así como *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 hospedadora usando técnicas de transfección y/o transducción conocidas en la materia. Como se usa en el presente documento, los términos, "transfección", y, "transducción", se refieren a los procesos mediante los cuales se introduce una secuencia de ácido nucleico exógeno en una célula hospedadora. El ácido nucleico puede integrarse en el ADN de la célula hospedadora o puede mantenerse extracromosómicamente. El ácido nucleico puede mantenerse de forma transitoria o puede ser una introducción estable. La transfección puede lograrse mediante una diversidad de medios conocidos en la técnica que incluyen, pero sin limitación, co-precipitación 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 uno o varios genes utilizando un vector vírico o retroviral mediante infección vírica en lugar de transfección. En determinadas realizaciones, los vectores retrovirales se transducen empaquetando los vectores en viriones antes de ponerse en contacto con una célula. Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un CAR de BCMA transportado por un vector retroviral puede transducirse a una célula mediante infección e integración pro virus.

Como se usa en el presente documento, la expresión "genomanipulado" o "modificado genéticamente" se refiere a la adición de material genético adicional en forma de ADN o ARN al material genético total de una célula. Las expresiones, "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 inmunoefectoras para redirigir su especificidad a un antígeno diana de interés, por ejemplo, una célula plasmática neoplásica, por ejemplo, de mieloma múltiple.

La presente invención proporciona métodos para producir células inmunoefectoras que expresan el CAR de la invención. En una realización, el método comprende transfectar o transducir células inmunoefectoras aisladas de un sujeto, tal como un sujeto que tiene una célula tumoral que expresa BCMA, de manera que las células inmunoefectoras expresen uno o más CAR como los de la invención. En determinadas realizaciones, las células inmunoefectoras se aíslan de un individuo y se modifican genéticamente sin manipulación adicional *in vitro*. Después, dichas células se pueden volver a administrar directamente al individuo. En realizaciones adicionales, las células inmunoefectoras se activan y estimulan primero para que proliferen *in vitro* antes de modificarse genéticamente para expresar un CAR. A este respecto, las células inmunoefectoras pueden cultivarse antes o después de modificarse genéticamente (es decir, transducirse o transfectarse para expresar un CAR de la invención).

Antes de la manipulación o modificación genética *in vitro* de las células inmunoefectoras descritas en el presente documento, la fuente de células puede obtenerse de un sujeto. En particular, las células inmunoefectoras para su uso con los CAR descritos en el presente documento comprenden células T. Las células T se pueden obtener de varias

fuentes, incluyendo células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de ganglios linfáticos, sangre del cordón umbilical, tejido del timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, derrame pleural, tejido del bazo y tumores. En determinadas realizaciones, las células T se pueden obtener de una unidad de sangre recogida de un sujeto utilizando cualquier serie de técnicas conocidas por el experto en la materia, tal como separación por FICOLL. En una realización, las células de la sangre circulante de un individuo se obtienen mediante aféresis. El producto de aféresis normalmente contiene linfocitos, incluidas células T, monocitos, granulocitos, células B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y plaquetas. En una realización, las células recogidas por aféresis se pueden lavar para eliminar la fracción de plasma y colocar las células en un tampón o medio adecuado para el posterior procesamiento. En una realización de la invención, las células se lavan con PBS. En una realización alternativa, la solución lavada carece de calcio y puede carecer de magnesio o puede carecer de muchos, si no todos, cationes divalentes. Como apreciarán los expertos en la materia, una etapa de lavado se puede realizar mediante métodos conocidos por los expertos en la materia, tal usando una centrífuga de flujo semiautomática. Después del lavado, las células pueden resuspenderse en una variedad de tampones biocompatibles u otra solución salina con o sin tampón. En determinadas realizaciones, los componentes no deseados de la muestra de aféresis pueden eliminarse en el medio de cultivo resuspendido directamente de las células.

En determinadas realizaciones, las células T se aíslan de células mononucleares de sangre periférica (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) causando la lisis de glóbulos rojos y el empobrecimiento de monocitos, por ejemplo, por centrifugación a través de un gradiente de PERCOLL™. Una subpoblación específica de células T, tal como de 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 se puede lograr con una combinación de anticuerpos dirigidos a marcadores de superficie exclusivos de las células seleccionadas negativamente. Un método para usar en el presente documento es la clasificación y/o selección de células mediante inmunoadherencia magnética negativa o citometría de flujo que utiliza un cóctel de anticuerpos monoclonales dirigidos a marcadores de la superficie celular presentes en las células seleccionadas negativamente. Por ejemplo, para el enriquecimiento de células CD4+ por selección negativa, un cóctel de anticuerpos monoclonales normalmente incluye anticuerpos contra CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR y CD8. También puede utilizarse citometría de flujo y clasificación celular para aislar poblaciones celulares de interés para su uso en la presente invención.

Las PBMC pueden utilizarse directamente para la modificación genética con los CAR utilizando los métodos descritos en el presente documento. En determinadas realizaciones, después del aislamiento de las PBMC, los linfocitos T también se aíslan y, en determinadas realizaciones, tanto los linfocitos T citotóxicos como los auxiliares pueden clasificarse en subpoblaciones de células T indiferenciadas, de memoria y efectoras, ya sea antes o después de la modificación y/o expansión genética. Las células CD8+ pueden obtenerse mediante métodos estándar. En algunas realizaciones, las células CD8+ también se clasifican en células indiferenciadas, de memoria central y efectoras, identificando antígenos de superficie celular que están asociados a cada uno de esos tipos de células CD8+. En las realizaciones, las células T de memoria están presentes en los subconjuntos CD62L+ y CD62L- de linfocitos CD8+ de sangre periférica. Las PBMC se clasifican en fracciones CD62L-CD8+ y CD62L+CD8+ después de la tinción con anticuerpos anti-CD8 y anti-CD62L. En algunas realizaciones, 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 realizaciones, las células T de memoria central son células T CD45RO+, CD62L+, CD8+. En algunas realizaciones, las células T efectoras son negativas para CD62L, CCR7, CD28 y CD127, y positivas para la granzima B y la perforina. En algunas realizaciones, los linfocitos T CD8+ indiferenciados se caracterizan por la expresión de marcadores fenotípicos de células T indiferenciadas, incluyendo CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD 127 y CD45RA.

En algunos casos, las células T CD4+ también se clasifican en subpoblaciones. Por ejemplo, las células T auxiliares CD4+ pueden clasificarse en células indiferenciadas, de memoria central y efectoras identificando poblaciones celulares que tienen antígenos de superficie celular. Los linfocitos CD4+ pueden obtenerse mediante métodos convencionales. En algunas realizaciones, los linfocitos T CD4+ indiferenciados son células T CD45RO-, CD45RA+, CD62L+CD4+. En algunas realizaciones, las células CD4+ de memoria central son positivas para CD62L y positivas para CD45RO. En algunas realizaciones, las células CD4+ efectoras son negativas para CD62L y CD45RO.

Las células inmunoelectoras, tales como las células T, pueden modificarse genéticamente después de su aislamiento mediante métodos conocidos, o las células inmunoelectoras pueden activarse y expandirse (o diferenciarse en el caso de que sean progenitoras) *in vitro* antes de modificarse genéticamente. En otra realización, las células inmunoelectoras, tales como las células T, se modifican genéticamente con los receptores de antígenos químicos descritos en el presente documento (por ejemplo, se transducen con un vector vírico que comprende un ácido nucleico que codifica un CAR) y después se activan y expanden *in vitro*. En la técnica se conocen métodos para activar y expandir células T y se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 6.905.874; patente de Estados Unidos n.º 6.867.041; patente de Estados Unidos n.º 6.797.514; documento WO2012079000. En general, dichos métodos incluyen poner en contacto PBMC o células T aisladas con un agente estimulador y un agente coestimulador, tales como anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, generalmente unidos a una perla u otra superficie, en un medio de cultivo con citocinas apropiadas, tal como IL-2. Los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 unidos a la misma perla sirven como célula presentadora de antígeno (APC, siglas del inglés) "sustituta". En otras realizaciones, las células T pueden activarse y estimularse para que proliferen con células alimentadoras y anticuerpos y citocinas apropiados usando

métodos tales como los descritos en las patentes de Estados Unidos n.º 6.040.177; patente de Estados Unidos n.º 5.827.642; y en el documento WO2012129514.

La invención proporciona una población de células inmunoefectoras 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 inmunoefectoras modificadas comprenden un CAR de BCMA de la invención.

Las células inmunoefectoras que expresan un CAR, preparadas como se describe en el presente documento, pueden utilizarse en métodos y composiciones para inmunoterapia adoptiva de acuerdo con técnicas conocidas, o variaciones de las mismas que serán evidentes para los expertos en la materia basándose en la presente divulgación. Véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2003/0170238 de Gruenberg et al; véase también la patente de Estados Unidos n.º 4.690.915 de Rosenberg.

En algunas realizaciones, las células se formulan recogiendo primero de su medio de cultivo y después lavándolas y concentrándolas en un medio y un sistema de recipientes adecuados para la administración (un portador "farmacéuticamente aceptable") en una cantidad eficaz para el tratamiento. Un medio de infusión adecuado puede ser cualquier formulación de medio isotónico, normalmente 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 se puede complementar con seroalbúmina humana.

Una cantidad de células eficaz para el tratamiento en la composición es de al menos 2 células (por ejemplo, al menos 1 célula T de memoria central CD8+ y al menos 1 subconjunto de células T auxiliares CD4+) o por lo general es mayor que 10^2 células, y hasta 10^6 hasta 10^8 inclusive o 10^9 células y puede tener 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 la misma.

Las células pueden ser autólogas o heterólogas para el paciente sometido a terapia. Si se desea, el tratamiento también puede incluir 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 y TNF- β , GM-CSF, IL-4, IL-13, Flt3/L, RANTES, MIP1 α , etc.) como se describe en el presente documento para mejorar la inducción de la respuesta inmunitaria.

Las poblaciones de células inmunoefectoras que expresan el CAR de la presente invención pueden administrarse en solitario o como una composición farmacéutica junto con diluyentes y/o con otros componentes tales como IL-2 u otras citocinas o poblaciones de células. Resumiendo, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender una población de células inmunoefectoras que expresan un CAR, tales como las células T, de la invención, junto 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; hidratos de carbono, 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 parenteral.

La respuesta inmunitaria antitumoral inducida en un sujeto mediante la administración de células T que expresan CAR descritas en el presente documento usando los métodos descritos en el presente documento, 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. También pueden inducirse respuestas inmunitarias humores, mediadas principalmente por células T auxiliares capaces de activar a las células B, lo que conduce a la producción de anticuerpos. Para analizar el tipo de respuestas inmunitarias inducidas por las composiciones de la presente invención puede utilizarse una variedad de técnicas, muy 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 tanto, la presente invención proporciona células inmunoefectoras que expresan el CAR de la invención, para su uso en métodos de tratamiento de un individuo con diagnóstico o sospecha de tener, o estar en riesgo de desarrollar, una neoplasia maligna hematopoyética caracterizada en parte por la acumulación anómala de células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas en la médula ósea, tal como en mieloma múltiple, que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de las células inmunoefectoras que expresan un CAR.

En una realización, la invención se refiere al receptor de antígeno quimérico de la invención para su uso en un método de tratamiento de un sujeto con diagnóstico de cáncer que expresa BCMA, que comprende eliminar células inmunoefectoras de un sujeto con diagnóstico de un cáncer que expresa BCMA, modificar genéticamente dichas células inmunoefectoras con un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico de la presente invención, produciendo así una población de células inmunoefectoras modificadas, y administrando al mismo sujeto la población de células inmunoefectoras modificadas. En una realización, las células inmunoefectoras comprenden células T.

Los métodos para administrar las composiciones celulares descritas en el presente documento incluyen cualquier

método que sea eficaz para dar como resultado la reintroducción de células inmunoefectoras 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 células inmunoefectoras que al introducirse en un sujeto se diferencian en células inmunoefectoras 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 devolver al sujeto las células transducidas.

Propiedades de unión de los receptores de antígenos quiméricos y de los anticuerpos correspondientes

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

Por ejemplo, la afinidad de unión corresponde normalmente a un valor K_D de aproximadamente 10^{-7} M o menor, tal como de aproximadamente 10^{-8} M o menor, tal como de aproximadamente 10^{-9} M o menor cuando se determina, por ejemplo, mediante tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR, *surface plasmon resonance*) en un instrumento BIAcore 3000 utilizando el antígeno como ligando y el anticuerpo o receptor de antígeno quimérico como analito (o antiligando). Las estrategias de unión basadas en células, tales como los ensayos de unión por clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS, *Fluorescent-Activated Cell Sorting*), también se utilizan de forma habitual, y los datos de FACS se correlacionan bien con los de otros métodos, tales como la unión por competición de radioligandos y la SPR (Benedict, CA, J Immunol Methods. 1997, 201(2):223-31; Geuijen, CA, *et al.* J Immunol Methods. 2005, 302(1-2):68-77).

En consecuencia, un receptor de antígeno quimérico o anticuerpo correspondiente, se une al antígeno predeterminado o a una molécula de la superficie celular (receptor) que tiene una afinidad correspondiente a un valor de K_D que es al menos diez veces inferior a su afinidad por la unión a un antígeno inespecífico (por ejemplo, BSA, caseína). De acuerdo con la presente divulgación, la afinidad de un receptor de antígeno quimérico o de un anticuerpo correspondiente con un valor de K_D igual o inferior a diez veces el de un antígeno inespecífico puede considerarse unión no detectable.

El término " K_D (M)" se refiere a la constante de equilibrio de disociación de una determinada interacción dominio de unión a antígeno:antígeno, o a la constante de equilibrio de disociación de un anticuerpo correspondiente a un antígeno. Existe una relación inversa entre la K_D y la afinidad de unión, por lo que cuanto menor es el valor de K_D , más alta, es decir, más fuerte, será la afinidad. Por tanto, las expresiones "mayor afinidad" o "afinidad más fuerte" se refieren a una mayor capacidad para formar una interacción y, por lo tanto, un valor de K_D más pequeño y, por el contrario, las expresiones "menor afinidad" o "afinidad más débil" se refieren a una menor capacidad para formar una interacción y, por lo tanto, un valor de K_D más alto. En algunas circunstancias, una mayor afinidad de unión (o K_D) de una molécula particular (por ejemplo, un receptor de antígeno quimérico o un anticuerpo correspondiente) a su molécula compañera interactiva (por ejemplo, antígeno X) en comparación con la afinidad de unión de la molécula (por ejemplo, receptor de antígeno quimérico o anticuerpo correspondiente) a otra molécula compañera interactiva (por ejemplo, antígeno Y) puede expresarse como una relación de unión determinada dividiendo el valor más alto de K_D (afinidad más baja o más débil) entre el valor más bajo de K_D (mayor afinidad o más fuerte), por ejemplo, expresada como afinidad de unión 5 veces o 10 veces superior, según sea el caso.

El término " k_d " (seg⁻¹ o 1/s) se refiere a la constante de velocidad de disociación de una determinada interacción de dominio de unión a antígeno:antígeno, o a la constante de velocidad de disociación de un receptor de antígeno quimérico o de un anticuerpo correspondiente. Dicho valor también se conoce como valor k_{off} .

El término " k_a " (M⁻¹ × seg⁻¹ o 1/M) se refiere a la constante de velocidad de asociación de una determinada interacción de dominio de unión a antígeno:antígeno, o a la constante de velocidad de asociación de un receptor de antígeno quimérico o de un anticuerpo correspondiente.

El término " K_A " (M⁻¹ o 1/M) se refiere a la constante de equilibrio de asociación de una determinada interacción de dominio de unión a antígeno:antígeno, o a la constante de equilibrio de asociación de un receptor de antígeno quimérico o de un anticuerpo correspondiente. La constante de equilibrio de asociación se obtiene dividiendo la k_a entre la k_d .

El término "CE₅₀" o "CE₅₀" se refiere a la mitad de la concentración eficaz máxima, que incluye la concentración de un receptor de antígeno quimérico que induce una respuesta a medio camino entre el valor inicial y el máximo después de un tiempo de exposición específico. La CE₅₀ representa esencialmente la concentración de un receptor de antígeno quimérico donde se observa el 50 % de su efecto máximo. En determinadas ocasiones, el valor de CE₅₀ es igual a la concentración de un receptor de antígeno quimérico o de un anticuerpo correspondiente que proporciona la mitad de la unión máxima con 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 tanto, se observa una unión reducida o más débil con un aumento de la CE₅₀, o valor de concentración eficaz semimáxima.

Por ejemplo, la disminución de la unión puede definirse como un aumento de la CE_{50} del receptor de antígeno quimérico o de la concentración del anticuerpo correspondiente que permite la unión a la cantidad semimáxima de células diana.

5

Variantes de secuencia de los receptores de antígenos quiméricos

Los receptores de antígenos quiméricos de la presente divulgación pueden comprender una o más sustituciones, inserciones y/o eliminaciones de aminoácidos en las regiones marco conservadas y/o CDR de los dominios variables de cadena pesada y ligera en comparación con las secuencias de la línea germinal correspondientes de las que proceden los dominios de unión a antígeno individuales. Dichas mutaciones pueden determinarse fácilmente comparando las secuencias de aminoácidos desveladas en el presente documento con secuencias de la línea germinal disponibles, por ejemplo, en bases de datos públicas de secuencias de anticuerpos. Los receptores de antígenos quiméricos de la presente divulgación pueden comprender dominios de unión a antígeno que proceden de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de región variable o CDR ilustrativas desveladas en el presente documento, en donde uno o más aminoácidos dentro de una o más regiones marco conservadas y/o CDR están mutados en el resto o restos correspondientes de la secuencia de la línea germinal de la que procede el anticuerpo correspondiente, o en el resto o restos correspondientes de otra secuencia de la línea germinal humana, o en una sustitución de aminoácidos conservativa del resto o restos de la línea germinal correspondiente (dichos cambios de secuencia se denominan en conjunto en el presente documento "mutaciones de la línea germinal"). Un experto en la materia, partiendo de las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera desveladas en el presente documento, puede producir fácilmente numerosos anticuerpos que comprenden una o más mutaciones individuales de la línea germinal o combinaciones de las mismas. En determinadas ocasiones, todos los restos de la región marco conservada y/o CDR dentro de los dominios V_H y/o V_L retromutan a los restos encontrados en la secuencia de línea germinal original de la cual se obtuvo originalmente el dominio de unión a antígeno. En otras ocasiones, únicamente determinados restos retromutan a la secuencia de línea germinal original, por ejemplo, únicamente los restos mutados encontrados dentro de los 8 primeros aminoácidos de FR1 o dentro de los 8 últimos aminoácidos de FR4, o únicamente los restos mutados encontrados dentro de CDR1, CDR2 o CDR3. En otras ocasiones, uno o más del resto o restos de marco y/o CDR están mutados al resto o restos correspondientes de una secuencia de línea germinal diferente (es decir, una secuencia de la línea germinal que es diferente de la secuencia de la línea germinal de la cual procedía originalmente el dominio de unión a antígeno). Asimismo, los dominios de unión a antígeno pueden contener cualquier combinación de dos o más mutaciones de línea germinal dentro de las regiones marco y/o CDR, por ejemplo, en donde determinados restos individuales mutan al resto correspondiente de una secuencia de la línea germinal particular, mientras que otros restos determinados, que difieren de los de la secuencia de la línea germinal original, se mantienen o mutan al resto correspondiente de una secuencia de línea germinal distinta.

Características biológicas de los receptores de antígenos quiméricos y de los anticuerpos correspondientes

La presente divulgación incluye receptores de antígenos quiméricos con dominios de unión a antígeno procedentes de anticuerpos que se unen al BCMA humano con alta afinidad (por ejemplo, valores nanomolares o subnanomolares de K_D).

De acuerdo con determinadas ocasiones, la presente divulgación incluye receptores de antígenos quiméricos con dominios de unión a antígeno procedentes de anticuerpos correspondientes que se unen al BCMA humano (por ejemplo, a 25 °C) con una K_D inferior a aproximadamente 5 nM medida por resonancia de plasmón superficial. En determinadas ocasiones, los anticuerpos correspondientes se unen al BCMA con una K_D inferior a aproximadamente 20 nM, inferior a aproximadamente 10 nM, inferior a aproximadamente 8 nM, inferior a aproximadamente 7 nM, inferior a aproximadamente 6 nM, inferior a aproximadamente 5 nM, inferior a aproximadamente 4 nM, inferior a aproximadamente 3 nM, inferior a aproximadamente 2 nM, inferior a aproximadamente 1 nM, inferior a aproximadamente 800 pM, inferior a aproximadamente 700 pM, inferior a aproximadamente 500 pM, inferior a aproximadamente 400 pM, inferior a aproximadamente 300 pM, inferior a aproximadamente 200 pM, inferior a aproximadamente 100 pM, inferior a aproximadamente 50 pM, o inferior a aproximadamente 25 pM medido por resonancia de plasmón superficial.

La presente divulgación también incluye receptores de antígenos quiméricos con dominios de unión a antígeno procedentes de anticuerpos correspondientes que se unen a BCMA con una semivida ($t_{1/2}$) disociativa mayor que aproximadamente 10 minutos o mayor que aproximadamente 125 minutos, medida por resonancia de plasmón superficial a 25 °C. En determinadas ocasiones, los anticuerpos correspondientes se unen al BCMA con una $t_{1/2}$ mayor que aproximadamente 3 minutos, mayor que aproximadamente 4 minutos, mayor que aproximadamente 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, medida por resonancia de plasmón superficial a 25 °C.

La presente divulgación también incluye receptores de antígenos quiméricos con dominios de unión a antígeno

procedentes de anticuerpos correspondientes que se unen específicamente a líneas celulares humanas que expresan BCMA endógeno (por ejemplo, NCI-H929, MOLP-8 u OMP-2), como se determina mediante un ensayo de unión FACS.

- 5 La presente divulgación también incluye células diseñadas que expresan receptores de antígenos quiméricos específicos de BCMA que (i) son activadas por células que expresan BCMA y/o (ii) presentan inhibición del crecimiento tumoral en ratones inmunodeprimidos portadores de xenoinjertos de mieloma múltiple humano.

Preparación de dominios de unión a antígeno

- 10 Los dominios de unión a antígeno de los receptores de antígenos quiméricos desvelados en el presente documento, que son específicos para antígenos particulares (por ejemplo, BCMA), puede prepararse mediante cualquier tecnología de generación de anticuerpos conocida en la técnica. En determinadas ocasiones, uno o más de los componentes individuales (por ejemplo, las cadenas pesadas y ligeras) de los anticuerpos correspondientes desvelados en el presente documento, proceden de anticuerpos quiméricos, humanizados o completamente humanos.
- 15 En la técnica se conocen bien métodos para fabricar dichos anticuerpos. Por ejemplo, una o más de las cadenas pesadas y/o ligeras pueden prepararse usando tecnología VELOCIMMUNE™. Usando la tecnología VELOCIMMUNE™ (o cualquier otra tecnología de generación de anticuerpos humanos), inicialmente se aíslan anticuerpos quiméricos de alta afinidad contra un antígeno particular (por ejemplo, BCMA) que tienen una región variable humana y una región constante de ratón. Los anticuerpos se caracterizan y seleccionan con respecto a
- 20 características deseables, que incluyen afinidad, selectividad, epítipo, etc. Como se indica en el presente documento, estas regiones variables humanas (o CDR) pueden incorporarse después en los dominios de unión a antígeno de los receptores de antígenos quiméricos.

Polinucleótidos y vectores

- 25 La presente invención también se refiere a polinucleótidos y vectores que codifican los receptores de antígenos quiméricos de la invención.
- 30 En diversas realizaciones, el polinucleótido puede comprender un casete de expresión o un vector de expresión (Por ejemplo, un plásmido para su introducción en una célula hospedadora bacteriana, o un vector vírico tal como un vector de baculovirus para la transfección de una célula hospedadora de insecto, o un plásmido o vector vírico, tal como un lentivirus, para la transfección de una célula hospedadora de mamífero).
- 35 En diversos aspectos de la divulgación, los polinucleótidos y/o vectores comprenden una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87 o SEQ ID NO: 89. En diversos aspectos de la divulgación, los polinucleótidos y/o vectores comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88 o SEQ ID NO: 90. En diversos aspectos de la divulgación, los polinucleótidos y/o vectores comprenden una
- 40 secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99 o SEQ ID NO: 100.

Métodos de diseño de células inmunitarias que expresan receptores de antígenos quiméricos

- 45 La presente invención abarca métodos de preparación de células inmunitarias para inmunoterapia, que comprenden introducir, *ex vivo*, en dichas células inmunitarias, los polinucleótidos o vectores que codifican uno de los receptores de antígenos quiméricos específicos de BCMA de la invención.

- 50 La presente invención también abarca células inmunitarias que comprenden un polinucleótido o un vector lentivírico que codifica uno de los receptores de antígenos quiméricos específicos de BCMA de la invención. En algunas realizaciones, estas células inmunitarias se utilizan para inmunoterapia (por ejemplo, para el tratamiento del cáncer).

- La presente invención también abarca métodos para modificar genéticamente células inmunitarias para hacerlas más adecuadas para el trasplante alogénico. De acuerdo con un primer aspecto, la célula inmunitaria puede volverse alogénica, por ejemplo, inactivando al menos un gen que exprese uno o más componentes del receptor de linfocitos 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 del síndrome de injerto contra huésped y de rechazo de injerto se reduce significativamente. De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, las células inmunitarias también pueden manipularse para hacerlas más activas o limitar el agotamiento, inactivando genes que codifican proteínas que actúan como "puntos de control inmunitarios" que actúan como reguladores de la
- 60 activación de células T, tales como PD1 o CTLA-4.

Células inmunitarias diseñadas

- 65 Las células inmunitarias que comprenden un receptor de antígeno quimérico de la invención (o células inmunitarias diseñadas) son otro objeto de la presente invención. En algunos casos, la célula inmunitaria es una célula inmoefectora. En algunos casos, la célula inmunitaria es una célula T. En algunos casos, la célula inmunitaria es

una célula T seleccionada 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+.

- 5 En algunas ocasiones, la célula inmunitaria diseñada es una célula T humana que comprende un receptor de antígeno quimérico que comprende, del extremo N al extremo C: (a) un dominio de unión a ligando extracelular que comprende un dominio de fragmento variable monocatenario (scFv) anti-BCMA 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.
- 10 En algunas ocasiones, el dominio scFv de la célula T humana diseñada comprende un par de secuencias de aminoácidos de 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 región bisagra comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97. En algunos casos, el dominio transmembrana comprende la secuencia de aminoácidos de 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 SEQ ID NO: 99. En algunos casos, el dominio de señalización es un dominio de señalización CD3zeta. En algunos casos, el dominio de señalización CD3zeta comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 100.
- 15
- 20 En diferentes ocasiones, la célula T humana diseñada comprende un receptor de antígeno quimérico que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88 o SEQ ID NO: 90.

Bioequivalentes

- 25 La presente divulgación abarca receptores de antígenos quiméricos y células diseñadas que expresan los receptores de antígenos quiméricos, que tienen secuencias de aminoácidos que varían de las de las moléculas ilustrativas desveladas en el presente documento pero que conservan la capacidad de unirse al BCMA, activar las células inmunitarias que expresan los receptores de antígenos quiméricos en presencia de células que expresan BCMA, o suprimir el crecimiento o la proliferación de células tumorales que expresan BCMA. Dichas moléculas variantes pueden comprender una o más adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos cuando se comparan con la secuencia precursora, pero presentan actividad biológica que es esencialmente equivalente a la de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas descritas.
- 30

- 35 Por ejemplo, dos células inmunitarias diseñadas que expresan un receptor de antígeno quimérico de la presente divulgación son bioequivalentes si no existen diferencias clínicamente significativas en su seguridad, pureza y potencia.

- 40 Por ejemplo, dos células inmunitarias diseñadas son bioequivalentes si se puede cambiar a un paciente una o más veces entre el producto de referencia y el producto biológico sin que se espere un aumento del riesgo de efectos adversos, incluyendo un cambio clínicamente significativo en la inmunogenicidad o una menor eficacia, en comparación con la terapia continuada sin dicho cambio.

- 45 Por ejemplo, dos células inmunitarias diseñadas son bioequivalentes si ambas actúan mediante un mecanismo o mecanismos de acción comunes para la afección o afecciones de uso, en la medida en que se conozcan dichos mecanismos.

- La bioequivalencia puede demostrarse por métodos *in vivo* e *in vitro*. Las medidas de bioequivalencia incluyen, por ejemplo, (a) una prueba *in vivo* en seres humanos u otros mamíferos, en la que se mide la concentración de la célula diseñada en sangre, plasma, suero u otro líquido biológico como una función del tiempo; (b) una prueba *in vitro* que se ha correlacionado con, y es razonablemente predictiva, de datos de biodisponibilidad *in vivo* en seres humanos; (c) una prueba *in vivo* en seres humanos u otros mamíferos en la que se mide el efecto farmacológico intenso adecuado de la célula diseñada (o su diana) como una función del tiempo; y (d) en un ensayo clínico bien controlado que establece la seguridad, eficacia, biodisponibilidad o bioequivalencia de una célula diseñada.
- 50

- 55 Se pueden construir variantes bioequivalentes de las células diseñadas ilustrativas expuestas en el presente documento, por ejemplo, haciendo diferentes sustituciones de restos o secuencias o eliminando secuencias o restos terminales o internos no necesarios para la actividad biológica.

Selectividad de especie y reactividad cruzada de especie

- 60 De acuerdo con determinados aspectos, se proporcionan dominios de unión a antígeno que se unen al BCMA humano, pero no al BCMA de otras especies. La presente divulgación también incluye moléculas de unión a antígeno que se unen al BCMA humano y al BCMA de una o más especies no humanas.

- 65 De acuerdo con determinados aspectos, se proporcionan dominios de unión a antígeno que se unen al BCMA humano y pueden unirse o no, según sea el caso, a uno o más BCMA de ratón, rata, cobaya, hámster, jerbo, cerdo, gato, perro, conejo, cabra, oveja, vaca, caballo, camello, mono cangrejero, tití, macaco de la India (*rhesus*) o chimpancé.

Activación y expansión de células inmunitarias diseñadas

Ya sea antes o después de la modificación genética de las células diseñadas (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 a antígeno, las células inmunitarias, particularmente las células T de la presente invención, pueden activarse adicionalmente y expandirse generalmente usando métodos como se describe, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos n.º 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 Estados Unidos n.º 20060121005. Las células T pueden expandirse *in vitro* o *in vivo*.

En general, las células T de la invención se expanden por contacto con un agente que estimula un complejo de 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, se pueden utilizar productos químicos tal como ionóforo de calcio A23187, forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) o lectinas mitógenas como fitohemaglutinina (PHA) para crear una señal de activación para la célula T.

Como ejemplos no limitativos, las poblaciones de células T pueden estimularse *in vitro*, tal como mediante contacto con un anticuerpo anti-CD3, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un anticuerpo anti-CD2 inmovilizado en una superficie, o por contacto con un activador de proteína cinasa 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 utiliza un ligando que une 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 Esencial Mínimo o Medio RPMI 1640 o, X-vivo 5, (Lonza)) que puede contener factores necesarios para la proliferación y la viabilidad, incluyendo 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 las células incluyen, pero sin limitación, 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 añadidos, piruvato de sodio y vitaminas, sin suero o complementado con una cantidad apropiada de suero (o plasma) o un conjunto definido de hormonas, y/o una cantidad de citocina(s) suficiente para el crecimiento y la expansión de las células T. Los antibióticos, por ejemplo, penicilina y estreptomycin, se incluyen solo en cultivos experimentales, no en cultivos de células que se infunden en un sujeto. Las células diana se mantienen en condiciones necesarias para dar soporte al crecimiento, por ejemplo, a una temperatura (por ejemplo, a 37 °C) y atmósfera (por ejemplo, aire con O₂ al 5 %) adecuadas. Las células T que han estado expuestas a diversos tiempos de estimulación pueden presentar características diferentes.

En otra realización particular, dichas células pueden expandirse mediante el cocultivo con tejido o células. Dichas células también 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 diseñada (por ejemplo, una célula T) que expresa un receptor de antígeno quimérico de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunos casos, las células diseñadas forman un medicamento, particularmente para inmunoterapia. En algunos casos, las células diseñadas se utilizan para el tratamiento del cáncer (por ejemplo, mieloma múltiple). En algunos casos, las células diseñadas se utilizan en la fabricación de un medicamento para inmunoterapia y/o para 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 diseñada (por ejemplo, una célula T) que expresa un receptor de antígeno quimérico de la invención. La composición terapéutica puede comprender una célula que exprese cualquier receptor de antígeno quimérico como se desvela en el presente documento y un portador, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, la expresión "un sujeto que lo necesite" significa un ser humano o animal no humano que presente uno o más síntomas o indicios de cáncer (por ejemplo, un sujeto que exprese un tumor o que padezca cualquiera de los cánceres mencionados en el presente documento) o que, de otro modo, se beneficie de una inhibición o reducción de la actividad de BCMA o de un empobrecimiento de células BCMA+ (por ejemplo, células de mieloma múltiple).

Las células diseñadas de la presente invención son útiles, entre otras cosas, para tratar cualquier enfermedad o trastorno en donde la estimulación, activación y/o direccionamiento de una respuesta inmunitaria resultase ser beneficioso. En particular, las células diseñadas de la presente invención pueden usarse para el tratamiento, la prevención y/o la mejora de cualquier enfermedad o trastorno asociado a, o mediado por, la expresión o actividad de BCMA o la proliferación de células BCMA+. Las células que expresan BCMA que pueden inhibirse o destruirse usando las células diseñadas de la invención incluyen, por ejemplo, células de mieloma múltiple.

Las células diseñadas de la presente invención pueden usarse para tratar una enfermedad o un trastorno asociado a la expresión de BCMA que incluye, por ejemplo, un cáncer que incluye mieloma múltiple u otros cánceres de células B o de células plasmáticas, como la macroglobulinemia de Waldenström, linfoma de Burkitt y linfoma difuso de células B grandes. En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno que expresa BCMA es la enfermedad de Castleman, linfoma linfoplasmacítico, linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma de la zona marginal, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin o leucemia linfocítica crónica. De acuerdo con determinadas realizaciones de la presente invención, las células diseñadas son útiles para tratar a un paciente que padece mieloma múltiple. Según otras realizaciones relacionadas de los aspectos de la invención, se proporcionan métodos que comprenden administrar una célula diseñada como se desvela en el presente documento a un paciente que padece mieloma múltiple. Se pueden utilizar métodos analíticos/diagnósticos conocidos en la técnica, como la exploración de tumores, etc., para determinar si un paciente padece mieloma múltiple u otro cáncer de linaje de células B.

La presente divulgación también se refiere a métodos para tratar el cáncer residual en un sujeto. Como se usa en el presente documento, la expresión "cáncer residual" significa la existencia o persistencia de una o más células cancerosas en un sujeto después de tratamiento con una terapia contra el cáncer.

De acuerdo con determinados aspectos, la presente invención se refiere a métodos para tratar una enfermedad o un trastorno asociado con la expresión de BCMA (por ejemplo, mieloma múltiple) que comprende administrar a un sujeto una población de células diseñadas de la invención después de que se haya determinado que dicho sujeto tiene mieloma múltiple. Por ejemplo, la presente invención incluye métodos para tratar el mieloma múltiple que comprenden administrar células inmunitarias diseñadas a un paciente durante 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 haya recibido otra inmunoterapia o quimioterapia.

Los tratamientos indicados en el presente documento pueden ser mejoradores, curativos o profilácticos. Los tratamientos pueden formar parte de una inmunoterapia autóloga o de una inmunoterapia alogénica. Por autóloga, se entiende que las células, la línea celular o la población de células utilizadas para tratar a los pacientes, se originan a partir de dicho paciente o de un donante compatible con el antígeno leucocitario humano (HLA, *Human Leucocyte Antigen*). Por alogénica se entiende que las células, la línea celular o la población de células utilizadas para tratar a los pacientes, no se originan a partir del paciente sino de un donante.

En el presente documento se describen células que pueden utilizarse con los métodos desvelados. Los tratamientos pueden usarse para tratar a pacientes con un diagnóstico de afección de cáncer preneoplásico o neoplásico caracterizado por células que expresan BCMA, especialmente por una sobreabundancia de células que expresan BCMA. Dichas afecciones se encuentran en cánceres, tales como mieloma múltiple.

Los tipos de cánceres a tratar con las células diseñadas de la invención incluyen, pero sin limitación, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström, linfoma de Burkitt y linfoma difuso de células B grandes, así como otros cánceres de células B o de células plasmáticas. En algunas realizaciones, las células diseñadas pueden utilizarse para tratar una enfermedad o un trastorno que exprese BCMA, tal como la enfermedad de Castleman, linfoma linfoplasmacítico, linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma de la zona marginal, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin o leucemia linfocítica crónica.

Las composiciones de la presente invención pueden utilizarse para tratar a un sujeto que se ha caracterizado por tener células o tejidos que expresan BCMA, o que 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, incluyendo inhalación en aerosol, inyección, ingestión, transfusión, implante o trasplante. Las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse a un paciente por vía subcutánea, intradérmica, intratumoral, intraganglionar, intramedular, intramuscular, por inyección intravenosa o intralinfática, o por vía intraperitoneal. En una realización, las composiciones celulares de la presente invención se administran preferentemente mediante inyección intravenosa.

La administración de las células o de la 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 incluyendo todos los valores enteros de números de células dentro de estos intervalos. Las células o la población de células pueden administrarse en una o más dosis. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de células se administra como una sola dosis. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de células se administra como más de una dosis durante un periodo de tiempo. El momento de la administración queda a criterio del médico responsable y depende del estado clínico del paciente. Las células o la población de células pueden obtenerse de cualquier fuente, tal como un banco de sangre o un donante. Si bien las necesidades individuales varían, la determinación de intervalos de cantidades eficaces de un tipo celular dado para una enfermedad o afección particular se encuentra dentro de las capacidades de la técnica. Una cantidad eficaz significa una cantidad que proporciona un beneficio terapéutico o profiláctico. La dosis administrada dependerá de la edad, la salud y el peso del receptor, el tipo de tratamiento simultáneo, caso de haberlo, la frecuencia del tratamiento y la naturaleza del efecto deseado.

En una realización, la cantidad eficaz de células o composición que comprende estas 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 realizaciones de la presente invención, las células se administran a un paciente junto con (por ejemplo, antes, simultáneamente o después de) cualquier número de modalidades de tratamiento relevantes, incluyendo, pero sin limitación, el tratamiento con agentes tales como terapia antivírica, cidofovir e interleucina-2, citarabina (también conocida como ARA-C) o el tratamiento con natalizimab para pacientes con MS o el tratamiento con efalizimab para pacientes con psoriasis u otros tratamientos para pacientes con PML. En realizaciones adicionales, las células T de la invención pueden usarse junto con quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos u otros agentes immunoablativos tal como CAMPATH, anticuerpos anti-CD3 u otras terapias de anticuerpos, citoxina, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228, citocinas e irradiación.

En una realización adicional, las composiciones celulares 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 que utiliza agentes quimioterápicos tales como, fludarabina, radioterapia de haz externo (XRT), ciclofosfamida o anticuerpos, tales como OKT3 o CAMPATH. En otra realización, las composiciones celulares de la presente invención se administran después de la terapia ablativa de células B, tales como agentes que reaccionan con CD20, por ejemplo, Rituxan. Por ejemplo, en una realización, los sujetos pueden someterse a un tratamiento estándar con dosis altas de quimioterapia seguida de trasplante de células madre de sangre periférica. En determinadas realizaciones, después del trasplante, los sujetos reciben una infusión de las células inmunitarias expandidas de la presente invención. En una realización adicional, las células expandidas se administran antes o después de la cirugía. En determinadas realizaciones, cualquier medio (por ejemplo, cirugía, quimioterapia o radioterapia) puede usarse para reducir la carga tumoral antes de la administración de las células inmunitarias expandidas de la invención. En una realización, la reducción de la carga tumoral antes de la administración de las células diseñadas de la invención, puede reducir el potencial de, o impedir, 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.

Terapias combinadas

La presente invención se refiere a métodos que comprenden administrar células o una población de células diseñadas que comprende cualquiera de los receptores de antígenos quiméricos de la invención junto con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Como agentes terapéuticos adicionales ilustrativos que pueden combinarse o administrarse junto con las células o la población de células de la presente invención, se incluyen, por ejemplo, un agente antitumoral (por ejemplo, agentes quimioterápicos, incluyendo melfalán, vincristina (Oncovin), ciclofosfamida (Cytosan), etopósido (VP-16), doxorubicina (Adriamicina), doxorubicina liposomal (Doxil), obendamustina (Treanda), o cualquier otro que se sepa que es eficaz en el tratamiento de un tumor de células plasmáticas en un sujeto). En algunas realizaciones, el segundo agente terapéutico comprende esteroides. En algunas realizaciones, el segundo agente terapéutico comprende terapias dirigidas que incluyen talidomida, lenalidomida y bortezomib, que son terapias aprobadas para tratar a pacientes recién diagnosticados. La lenalidomida, pomalidomida, bortezomib, carfilzomib, panobinostat, ixazomib, elotuzumab y daratumumab, son ejemplos de un segundo agente terapéutico eficaz para tratar el mieloma recurrente. En determinadas realizaciones, el segundo agente terapéutico es un régimen que comprende radioterapia o un trasplante de células madre. En determinadas realizaciones, el segundo agente terapéutico puede ser un agente inmunomodulador. En determinadas realizaciones, el segundo agente terapéutico puede ser un inhibidor del proteosoma, incluido bortezomib (Velcade), carfilzomib (Kyprolis), ixazomib (Ninlaro). En determinadas realizaciones, el segundo agente terapéutico puede ser un inhibidor de histona desacetilasa tal como panobinostat (Farydak). En determinadas realizaciones, el segundo agente terapéutico puede ser un anticuerpo monoclonal, un conjugado de anticuerpo-fármaco, un anticuerpo bispecífico conjugado con un agente antitumoral, un inhibidor de punto de control, o combinaciones de los mismos. Otros agentes que pueden administrarse de manera beneficiosa junto con las moléculas de unión a antígeno de la invención incluyen inhibidores de citocina, incluyendo inhibidores de citocina 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 a sus receptores respectivos. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención (por ejemplo, las composiciones farmacéuticas que comprenden células o poblaciones de células diseñadas como se desvela en el presente documento) también pueden administrarse como parte de un régimen terapéutico que comprende una o más combinaciones terapéuticas seleccionadas de un anticuerpo monoclonal distinto de los descritos en el presente documento, que puede interactuar con un antígeno diferente en la superficie de las células plasmáticas, un anticuerpo bispecífico, 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 en una célula T, un conjugado de anticuerpo-fármaco, un anticuerpo bispecífico conjugado con un agente antitumoral, un inhibidor del punto de control, por ejemplo, uno que se dirige a PD-1 o a CTLA-4, o combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, los inhibidores del punto de control pueden seleccionarse de inhibidores de PD-1, tales como pembrolizumab (Keytruda), nivolumab (Opdivo) o cemiplimab (REGN2810). En determinadas realizaciones, los inhibidores del punto de control pueden seleccionarse de inhibidores de PD-L1, tales como atezolizumab (Tecentriq), avelumab (Bavencio) o Durvalumab (Imfinzi). En determinadas realizaciones, los inhibidores del punto de control pueden seleccionarse de inhibidores de CTLA-4, tales

como ipilimumab (Yervoy).

La presente invención también incluye combinaciones terapéuticas que comprenden cualquiera de las células o poblaciones de células diseñadas mencionadas en el presente documento 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, TMRSS2, MSLN, CA9, uroplaquina o cualquiera de las citocinas mencionadas anteriormente, en donde el inhibidor es un 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 diseñadas, tales como diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos y unidades de reconocimiento mínimas). En algunas realizaciones, las células o poblaciones de células diseñadas de la invención también pueden administrarse como parte de un régimen de tratamiento que también incluye tratamiento radioterapia y/o quimioterapia convencional.

El/los componente/s terapéuticamente activo/s adicional/es puede/n administrarse justo antes, simultáneamente o poco después de la administración de las células diseñadas de la presente invención; (para los fines de la presente divulgación, se considera que dichos regímenes de administración son la administración de las células diseñadas "junto con" un componente adicional terapéuticamente activo).

La presente invención incluye composiciones farmacéuticas en las que una célula o población de células diseñadas de la presente invención se coformulan con uno o más de los componentes adicionales terapéuticamente activos como se describe en cualquier otra parte del presente documento.

Regímenes de administración

De acuerdo con determinadas realizaciones de la presente invención, pueden administrarse múltiples dosis de las células diseñadas a un sujeto durante un ciclo de tiempo definido. Los métodos de acuerdo con este aspecto de la invención comprenden administrar secuencialmente a un sujeto múltiples dosis de las células. Como se usa en el presente documento, "administrar secuencialmente" significa que al sujeto se le administra cada dosis en un punto temporal diferente, por ejemplo, en días distintos separados por un intervalo predeterminado (por ejemplo, horas, días, semanas o meses). La presente invención incluye métodos que comprenden administrar secuencialmente al paciente una sola dosis inicial, seguida de una o más dosis secundarias, y opcionalmente, seguida de una o más dosis terciarias.

Las expresiones "dosis inicial", "dosis secundarias", y "dosis terciarias", se refieren a la secuencia temporal de administración de las células diseñadas de la invención. Por tanto, la "dosis inicial" es la dosis que se administra al inicio 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. Todas las dosis, inicial, secundaria y terciaria, pueden contener la misma cantidad de células diseñadas, pero generalmente pueden diferir entre sí en términos de frecuencia de administración. En determinadas realizaciones, sin embargo, la cantidad de células diseñadas contenidas en las dosis inicial, secundaria y/o terciaria, varían entre sí (por ejemplo, se ajustan hacia arriba o hacia abajo según corresponda) durante el transcurso del tratamiento. En determinadas realizaciones, dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4 o 5) dosis se administran al comienzo del régimen de tratamiento como "dosis de carga" seguidas de dosis posteriores que se administran con menos frecuencia (por ejemplo, "dosis de mantenimiento").

En una realización ilustrativa de la presente invención, cada dosis secundaria y/o terciaria se administra 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 expresión "la dosis inmediatamente anterior", como se usa en el presente documento, significa, en una secuencia de administraciones múltiples, la dosis que se administra a un paciente antes de la administración de la siguiente dosis de 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 realizaciones, al paciente se le administra únicamente una sola dosis secundaria. En otras realizaciones, al paciente se le administran dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más) dosis secundarias. Del mismo modo, en determinadas realizaciones, al paciente se le administra únicamente una sola dosis terciaria. En otras realizaciones, al paciente se le administran dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más) dosis terciarias.

En realizaciones 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 de 1 a 2 semanas después de la dosis inmediatamente anterior. De manera similar, en realizaciones 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 de 2 a 4 semanas después de la dosis inmediatamente anterior. Como alternativa, la frecuencia a 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 administración también puede

ajustarla un médico en el transcurso del tratamiento, dependiendo de las necesidades del paciente individual, después de la exploración clínica.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos son ilustrativos, pero no limitan el alcance de las reivindicaciones.

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos anti-BCMA

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

Después de la inmunización, se extrajeron 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 analizaron para determinar la especificidad de BCMA, o (2) se clasificaron células B (como se describe en el documento US 2007/0280945A1) usando un fragmento de BCMA humano como reactivo de clasificación que se une e identifica anticuerpos reactivos (células B positivas a antígeno).

Inicialmente se aislaron anticuerpos quiméricos contra BCMA que tenían una región variable humana y una región constante de ratón. Los anticuerpos se caracterizaron y seleccionaron en cuanto a características deseables, que incluyen afinidad, selectividad, etc. Cuando fue necesario, las regiones constantes de ratón se reemplazaron por una región constante humana deseada, por ejemplo, una región constante de IgG1 o IgG4 de tipo natural o modificada, para generar un anticuerpo anti-BCMA completamente humano. Si bien la región constante seleccionada puede variar según el uso específico, las características de unión a antígeno de alta afinidad y especificidad de diana residen en la región variable.

Secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de la región variable de cadena pesada y ligera de los anticuerpos anti-BCMA: En la Tabla 1 se muestran los identificadores de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y ligera y las CDR de los anticuerpos anti-BCMA seleccionados de la divulgación. En la Tabla 2 se muestran los identificadores de las secuencias de ácidos nucleicos correspondientes.

Tabla 1: Identificadores de secuencias de aminoácidos

Denominación del anticuerpo	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb16711	2	4	6	8	10	12	14	16
mAb16716	18	20	22	24	26	28	30	32
mAb16732	34	36	38	40	42	44	46	48
mAb16747	50	52	54	56	58	60	62	64
mAb21581	66	68	70	72	74	76	78	80

Tabla 2: Identificadores de secuencias de ácidos nucleicos

Denominación del anticuerpo	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb16711	1	3	5	7	9	11	13	15
mAb16716	17	19	21	23	25	27	29	31
mAb16732	33	35	37	39	41	43	45	47
mAb16747	49	51	53	55	57	59	61	63
mAb21581	65	67	69	71	73	75	77	79

Ejemplo 2: Generación de receptores de antígenos quiméricos específicos de BCMA

Seis anticuerpos anti-BCMA (mAb16711, mAb16716, mAb16732, mAb16747 y mAb21581) se reformatearon en fragmentos variables monocatenarios (ScFv) VL-VH y se colocaron en una construcción de receptor de antígeno quimérico (CAR) que utilizaba una bisagra CD8 α y un dominio transmembrana, un dominio coestimulador 4-1BB y un dominio estimulador CD3 ζ . Los CAR específicos de BCMA se clonaron en un vector de expresión de lentivirus (sistema de expresión bicistrónico Lenti-X™ (Neo), Clontech Cat. n.º 632181) y las partículas de lentivirus se generaron mediante el sistema Lenti-X Packaging Single-Shot (VSV-G) (Clontech Cat. n.º 631276) de acuerdo con los protocolos del fabricante. Después, se transdujeron células Jurkat diseñadas para expresar un indicador de luciferasa-NFAT (Jurkat/NFATLuc cl. 3C7) con las diferentes construcciones de CAR usando placas previamente recubiertas RetroNectin® (Clontech, Cat. n.º T110a) de acuerdo con los protocolos del fabricante. Después de la selección durante al menos 2 semanas en 500 μ g/ml de G418 (Gibco, Cat n.º 11811-098), se generaron las siguientes líneas celulares 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 de CAR utilizadas en la generación de estas líneas celulares T-CAR, como se ilustra en la Figura 1, se muestran en las SEQ ID NO: 81 (mAb16711 VUVH), 83 (mAb16716 VUVH), 85 (mAb16732 VUVH), 87 (mAb16747 VUVH) y 89 (mAb21581 VUVH). Estas seis líneas celulares T-CAR se utilizaron para evaluar la expresión y activación de las células T-CAR de BCMA en la superficie celular, como se indica en el Ejemplo 3.

Se construyeron receptores de antígenos quiméricos que contenían un scFv anti-BCMA VL-VH, un dominio transmembrana huCD8, un dominio coestimulador 4-1BB y un dominio de señalización Cd3ζ, utilizando las secuencias de nucleótidos de VL y VH de dos anticuerpos anti-BCMA, mAb21581 y mAb16747 (que corresponden a las SEQ ID NO: 89 y 87, respectivamente). Como control no unido, se diseñó un CAR similar usando la secuencia de nucleótidos de un scFv irrelevante (construcción CAR de SEQ ID NO: 91). Estos CAR se clonaron en un vector de lentivirus pLVX con un promotor EF1a y una secuencia IRES:eGFP (para rastrear células transducidas con CAR) y se produjo un lentivirus pseudotipificado con VSV.

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

Ejemplo 3: Expresión en la superficie celular de construcciones CAR de BCMA en células Jurkat y activación de células T-CAR de BCMA

Se accedió a la expresión relativa de la superficie celular de las construcciones CAR de BCMA en células Jurkat/NFATLuc mediante citometría de flujo. Para la tinción, las células se sembraron en placas en tampón de tinción (PBS, sin calcio y magnesio (Irving 9240) + FBS el 2 % (ATCC 30-2020) a una densidad de 200.000 células por pocillo en una placa con fondo en V de 96 pocillos y se tiñeron durante 30 minutos a 4 °C con 10 µg/ml del dominio extracelular de BCMA fusionado a una hlgG1-Fc (BCMA ecto-hFc) o una proteína irrelevante fusionada a 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-Fluor 647 (Jackson ImmunoResearch, Cat. n.º 109-606-170) a 10 µg/ml durante 30 minutos a 4 °C. Después, las células se lavaron y fijaron usando una solución de BD Cytotfix al 50 % (BD, Cat. n.º 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 media fluorescente (IMF). La relación señal/ruido (S:R) se determina tomando la relación entre la IMF de control de isotipo BCMA-hFc o Fc y la IMF del anticuerpo secundario solo.

La actividad de las líneas T-CAR se evaluó en un bioensayo T-CAR/APC (siglas del inglés *Antigen Presenting Cell*, célula presentadora de antígeno). Para realizar el bioensayo, se añadieron 50.000 células T-CAR a placas blancas de 96 pocillos Thermo-Nunc (Thermo Scientific, Cat. n.º 136101) en 50 µl de medio de ensayo (medio RPMI con FBS al 10 % y P/S/G al 1 %) seguido de la adición de una dilución en serie triple de las APC (500.000 células a 685 células) en 50 µl de medio de ensayo. Se utilizaron las siguientes APC: RAJI, Daudi, RPMI8226 (BCMA expresado endógenamente) y HEK293 (BCMA negativo). La mezcla de células se incubó durante 5 horas en una incubadora humificada a 37 °C, con CO₂ al 5 %. La actividad NFAT-luciferasa se midió utilizando Promega One-Glo (Cat. n.º E6130) y un lector de placas Perkin Elmer Envision. Se generaron unidades relativas de luciferasa (URL) y se representaron en GraphPad Prism utilizando una ecuación logística de cuatro parámetros sobre una curva de respuesta de 8 puntos. En el análisis también se incluye la condición de APC cero de cada curva de respuesta a la dosis como una continuación de la dilución en serie triple y se representa como la dosis más baja. La actividad de T-CAR se determinó tomando la relación entre las URL más altas de la curva y las más bajas y se representa como señal:ruido (S:R) en la Tabla 4.

La Tabla 3 muestra que las T-CAR 16747 y 21581 tenían una expresión superficial similar con una S:R que variaba entre 209 y 273, la T-CAR 16716 se expresó a 44 veces por encima del fondo, mientras que la expresión de CAR 16732 y 16711 fue mucho menor con una S:R de 13 y 4, respectivamente.

La Tabla 4 muestra que las seis líneas celulares de T-CAR de BCMA fueron activadas por células RAJI, Daudi y RPMI8226. HEK293 no activó ninguna línea celular T-CAR. El CAR de BCMA 16747 tuvo la activación más fuerte en el bioensayo T-CAR/APC, mientras que el CAR 16711 tuvo la actividad más débil independientemente de la APC que expresase el 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 de BCMA

Línea Celular	S:R (BCMA-hFc)	S:R (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 T-CAR DE BCMA en un bioensayo T-CAR/APC

Célula presentadora de antígeno	Actividad máxima de T-CAR					
	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

5 Ejemplo 4: Las células T-CAR 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 de antígeno quimérico (CAR) dirigidas a BCMA, se realizó un estudio de tumor xenogénico en ratones utilizando células de mieloma múltiple humano OPM-2, que expresan altos niveles de BCMA.

Implantación y medición de tumores xenogénicos: El día 0, a ratones NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) inmunodeficientes se les administró por vía intravenosa 2×10^6 células tumorales de mieloma múltiple humano OPM-2 BCMA⁺ que se diseñaron para expresar también luciferasa de luciérnaga (células OPM-2-luciferasa). El día 21, a los ratones se les inyectó por vía intravenosa 2×10^6 células T que expresaban el CAR de control o un CAR anti-BCMA (según lo determinado por la frecuencia de las células que expresan GFP, que es un marcador de aquellas células que han sido transducidas con CAR). Los ratones (n=5 por grupo) recibieron una administración de 2×10^6 T CAR scFc irrelevantes (control scFv CAR), 2×10^6 T CAR anti-BCMA que codifica el CAR scFv 21581 o 2×10^6 T CAR anti-BCMA que codifica el scFv 16747. El crecimiento del tumor se evaluó hasta el día 61 midiendo la bioluminiscencia (BLI) tumoral en animales anestesiados. Como control positivo, un grupo de ratones (n=5) recibió únicamente células OPM-2-luciferasa, pero no células T. Para medir los niveles de BLI de fondo, un grupo de ratones (n=5) no recibió tratamiento y no recibió tumores ni células T.

Medición del crecimiento de tumores xenogénicos: Para medir la carga tumoral se utilizaron imágenes de BLI. Los ratones recibieron una inyección IP de 150 mg/kg del sustrato de luciferasa D-luciferina suspendido en PBS. Cinco minutos después de esta inyección, se tomaron imágenes de BLI de los ratones anestesiados con isoflurano usando el sistema Xenogen IVIS. La adquisición de imágenes se llevó a cabo con el campo de visión en D, a una altura del sujeto de 1,5 cm y un nivel de agrupación medio con un tiempo de exposición automático determinado por el programa informático Living Image. Las señales de las BLI se extrajeron utilizando el programa informático Living Image: se dibujaron regiones de interés alrededor de cada masa tumoral y se registraron las intensidades de los fotones como p/s/cm²/sr.

Mientras que los tumores de OPM-2-luciferasa BCMA⁺ crecieron progresivamente en ratones que recibieron 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 la carga tumoral a niveles de fondo en todos los animales. Los resultados se muestran en la Tabla 5a, a continuación.

Tabla 5a: Tamaño promedio del tumor (por radiancia) en diferentes puntos temporales

T CAR Tratamiento	Radiancia [p/s/cm ² /sr] 5 días después de la implantación (media ± ETM)
Sin tumor (BLI de fondo)	6,22E+05 ± 2,77E+04
Sin T CAR (control positivo)	5,62E+05 ± 2,75E+04
T CAR de control (scFv irrelevante) 2×10 ⁶ células	5,95E+05 ± 2,40E+04
CAR anti-BCMA (21581 scFv) 2×10 ⁶ células	6,07E+05 ± 3,97E+04
CAR anti-BCMA (16747 scFv) 2×10 ⁶ células	5,54E+05 ± 2,80E+04

T CAR Tratamiento	Radiancia [p/s/cm²/sr] 11 días después de la implantación (media ± ETM)
Sin tumor (BLI de fondo)	6,90E+05 ± 3,64E+04
Sin T CAR (control positivo)	6,22E+05 ± 3,34E+04
T CAR de control (scFv irrelevante) 2×10 ⁶ células	6,80E+05 ± 2,76E+04
CAR anti-BCMA (21581 scFv) 2×10 ⁶ células	7,13E+05 ± 2,90E+04
CAR anti-BCMA (16747 scFv) 2×10 ⁶ células	6,30E+05 ± 2,42E+04
T CAR Tratamiento	Radiancia [p/s/cm²/sr] 20 días después de la implantación (media ± ETM)
Sin tumor (BLI de fondo)	7,59E+05 ± 5,82E+04
Sin T CAR (control positivo)	2,32E+06 ± 2,94E+05
T CAR de control (scFv irrelevante) 2×10 ⁶ células	2,80E+06 ± 5,26E+05
CAR anti-BCMA (21581 scFv) 2×10 ⁶ células	3,06E+06 ± 4,42E+05
CAR anti-BCMA (16747 scFv) 2×10 ⁶ células	2,53E+06 ± 2,22E+05
T CAR Tratamiento	Radiancia [p/s/cm²/sr] 26 días después de la implantación (media ± ETM)
Sin tumor (BLI de fondo)	5,51E+05 ± 2,51E+04
Sin T CAR (control positivo)	5,96E+06 ± 8,74E+05
T CAR de control (scFv irrelevante) 2×10 ⁶ células	8,03E+06 ± 1,41E+06
CAR anti-BCMA (21581 scFv) 2×10 ⁶ células	6,76E+06 ± 1,34E+06
CAR anti-BCMA (16747 scFv) 2×10 ⁶ células	6,96E+06 ± 3,39E+05
T CAR Tratamiento	Radiancia [p/s/cm²/sr] 31 días después de la implantación (media ± ETM)
Sin tumor (BLI de fondo)	6,62E+05 ± 3,35E+04
Sin T CAR (control positivo)	1,58E+07 ± 4,84E+06
T CAR de control (scFv irrelevante) 2×10 ⁶ células	1,57E+07 ± 3,05E+06
CAR anti-BCMA (21581 scFv) 2×10 ⁶ células	1,44E+07 ± 2,12E+06
CAR anti-BCMA (16747 scFv) 2×10 ⁶ células	1,01E+07 ± 5,46E+05
T CAR Tratamiento	Radiancia [p/s/cm²/sr] 34 días después de la implantación (media ± ETM)
Sin tumor (BLI de fondo)	4,57E+05 ± 1,04E+04
Sin T CAR (control positivo)	3,36E+07 ± 1,27E+07
T CAR de control (scFv irrelevante) 2×10 ⁶ células	3,00E+07 ± 2,82E+06
CAR anti-BCMA (21581 scFv) 2×10 ⁶ células	2,05E+07 ± 3,56E+06
CAR anti-BCMA (16747 scFv) 2×10 ⁶ células	8,31E+06 ± 9,79E+05
T CAR Tratamiento	Radiancia [p/s/cm²/sr] 38 días después de la implantación (media ± ETM)
Sin tumor (BLI de fondo)	6,60E+05 ± 3,13E+04
Sin T CAR (control positivo)	3,91 E+07 ± 6,87E+06

(continuación)

T CAR Tratamiento	Radiancia [p/s/cm²/sr] 38 días después de la implantación (media ± ETM)
T CAR de control (scFv irrelevante) 2×10 ⁶ células	4,25E+07 ± 5,08E+06
CAR anti-BCMA (21581 scFv) 2×10 ⁶ células	2,19E+07 ± 7,88E+06
CAR anti-BCMA (16747 scFv) 2×10 ⁶ células	1,90E+06 ± 1,20E+06
T CAR Tratamiento	Radiancia [p/s/cm²/sr] 40 días después de la implantación (media ± ETM)
Sin tumor (BLI de fondo)	5,39E+05 ± 9,67E+03
Sin T CAR (control positivo)	Animales sacrificados
T CAR de control (scFv irrelevante) 2×10 ⁶ células	Animales sacrificados
CAR anti-BCMA (21581 scFv) 2×10 ⁶ células	1,13E+07 ± 4,84E+06
CAR anti-BCMA (16747 scFv) 2×10 ⁶ células	8,71E+05 ± 2,80E+05
T CAR Tratamiento	Radiancia [p/s/cm²/sr] 47 días después de la implantación (media ± ETM)
Sin tumor (BLI de fondo)	7,73E+05 ± 1,91E+04
Sin T CAR (control positivo)	Animales sacrificados
T CAR de control (scFv irrelevante) 2×10 ⁶ células	Animales sacrificados
CAR anti-BCMA (21581 scFv) 2×10 ⁶ células	3,17E+07 ± 3,11 E+07
CAR anti-BCMA (16747 scFv) 2×10 ⁶ células	8,85E+05 ± 3,72E+04
T CAR Tratamiento	Radiancia [p/s/cm²/sr] 54 días después de la implantación (media ± ETM)
Sin tumor (BLI de fondo)	7,49E+05 ± 1,95E+04
Sin T CAR (control positivo)	Animales sacrificados
T CAR de control (scFv irrelevante) 2×10 ⁶ células	Animales sacrificados
CAR anti-BCMA (21581 scFv) 2×10 ⁶ células	4,34E+07 ± 4,29E+07
CAR anti-BCMA (16747 scFv) 2×10 ⁶ células	8,24E+05 ± 5,48E+04
T CAR Tratamiento	Radiancia [p/s/cm²/sr] 61 días después de la implantación (media ± ETM)
Sin tumor (BLI de fondo)	6,18E+05 ± 2,77E+04
Sin T CAR (control positivo)	Animales sacrificados
T CAR de control (scFv irrelevante) 2×10 ⁶ células	Animales sacrificados
CAR anti-BCMA (21581 scFv) 2×10 ⁶ células	6,41E+05 ± 4,07E+04
CAR anti-BCMA (16747 scFv) 2×10 ⁶ células	5,40E+05 ± 2,93E+04

Se realizó un experimento adicional como se ha indicado anteriormente, excepto que los ratones recibieron por vía intravenosa una inyección de 2×10⁶ células T que expresaban el CAR de control o un CAR anti-BCMA el día 22 (en lugar del día 21), y el crecimiento del tumor se evaluó hasta el día 56 (en lugar de hasta el día 61).

Mientras que los tumores de OPM-2-luciferasa BCMA⁺ 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, a continuación.

Tabla 5b: Tamaño promedio del tumor (por radiancia) en diferentes puntos temporales

Tratamiento con T CAR	Radiancia [p/s/cm²/sr] 14 días después de la implantación (media ± ETM)
Sin tumor (BLI de fondo)	6,72E+05 ± 1,50E+04
Sin T CAR (control positivo)	7,93E+05 ± 8,18E+04
T CAR de control (scFv irrelevante) 2×10 ⁶ células	7,09E+05 ± 2,13E+04
CAR anti-BCMA (21581N scFv) 2×10 ⁶ células	7,87E+05 ± 1,20E+05
CAR anti-BCMA (16747P scFv) 2×10 ⁶ células	8,93E+05 ± 9,05E+04
Tratamiento con T CAR	Radiancia [p/s/cm²/sr] 20 días después de la implantación (media ± ETM)
Sin tumor (BLI de fondo)	5,32E+05 ± 3,64E+04
Sin T CAR (control positivo)	3,07E+06 ± 3,01 E+05
T CAR de control (scFv irrelevante) 2×10 ⁶ células	2,91E+06 ± 2,46E+05
CAR anti-BCMA (21581N scFv) 2×10 ⁶ células	2,57E+06 ± 8,27E+05
CAR anti-BCMA (16747P scFv) 2×10 ⁶ células	3,13E+06 ± 5,97E+05
Tratamiento con T CAR	Radiancia [p/s/cm²/sr] 23 días después de la implantación (media ± ETM)
Sin tumor (BLI de fondo)	5,56E+05 ± 4,29E+04
Sin T CAR (control positivo)	1,01E+07 ± 1,28E+06
T CAR de control (scFv irrelevante) 2×10 ⁶ células	8,37E+06 ± 1,38E+06
CAR anti-BCMA (21581N scFv) 2×10 ⁶ células	1,00E+07 ± 3,92E+06
CAR anti-BCMA (16747P scFv) 2×10 ⁶ células	8,26E+06 ± 1,59E+06
Tratamiento con T CAR	Radiancia [p/s/cm²/sr] 27 días después de la implantación (media ± ETM)
Sin tumor (BLI de fondo)	5,18E+05 ± 2,87E+04
Sin T CAR (control positivo)	1,67E+07 ± 1,54E+06
T CAR de control (scFv irrelevante) 2×10 ⁶ células	1,47E+07 ± 2,36E+06
CAR anti-BCMA (21581N scFv) 2×10 ⁶ células	1,59E+07 ± 6,36E+06
CAR anti-BCMA (16747P scFv) 2×10 ⁶ células	1,03E+07 ± 1,71E+06
Tratamiento con T CAR	Radiancia [p/s/cm²/sr] 30 días después de la implantación (media ± ETM)
Sin tumor (BLI de fondo)	5,18E+05 ± 1,29E+04
Sin T CAR (control positivo)	1,93E+07 ± 3,10E+06
T CAR de control (scFv irrelevante) 2×10 ⁶ células	2,03E+07 ± 2,48E+06
CAR anti-BCMA (21581N scFv) 2×10 ⁶ células	7,21E+06 ± 1,97E+06
CAR anti-BCMA (16747P scFv) 2×10 ⁶ células	1,16E+07 ± 3,61E+06
Tratamiento con T CAR	Radiancia [p/s/cm²/sr] 34 días después de la implantación (media ± ETM)
Sin tumor (BLI de fondo)	5,66E+05 ± 3,76E+04

(continuación)

Tratamiento con T CAR	Radiancia [p/s/cm ² /sr] 34 días después de la implantación (media ± ETM)
Sin T CAR (control positivo)	3,69E+07 ± 6,27E+06
T CAR de control (scFv irrelevante) 2×10 ⁶ células	4,07E+07 ± 4,13E+06
CAR anti-BCMA (21581N scFv) 2×10 ⁶ células	5,74E+05 ± 1,24E+04
CAR anti-BCMA (16747P scFv) 2×10 ⁶ células	1,66E+06 ± 9,09E+05
Tratamiento con T CAR	Radiancia [p/s/cm ² /sr] 38 días después de la implantación (media ± ETM)
Sin tumor (BLI de fondo)	5,43E+05 ± 3,32E+04
Sin T CAR (control positivo)	Animales sacrificados
T CAR de control (scFv irrelevante) 2×10 ⁶ células	5,87E+07 ± 5,72E+06
CAR anti-BCMA (21581N scFv) 2×10 ⁶ células	5,39E+05 ± 1,58E+04
CAR anti-BCMA (16747P scFv) 2×10 ⁶ células	5,55E+05 ± 5,02E+04
Tratamiento con T CAR	Radiancia [p/s/cm ² /sr] 44 días después de la implantación (media ± ETM)
Sin tumor (BLI de fondo)	6,42E+05 ± 3,33E+04
Sin T CAR (control positivo)	Animales sacrificados
T CAR de control (scFv irrelevante) 2×10 ⁶ células	Animales sacrificados
CAR anti-BCMA (21581N scFv) 2×10 ⁶ células	6,68E+05 ± 3,09E+04
CAR anti-BCMA (16747P scFv) 2×10 ⁶ células	5,39E+05 ± 2,25E+04
Tratamiento con T CAR	Radiancia [p/s/cm ² /sr] 56 días después de la implantación (media ± ETM)
Sin tumor (BLI de fondo)	8,10E+05 ± 5,92E+04
Sin T CAR (control positivo)	Animales sacrificados
T CAR de control (scFv irrelevante) 2×10 ⁶ células	Animales sacrificados
CAR anti-BCMA (21581N scFv) 2×10 ⁶ células	6,37E+05 ± 2,71E+04
CAR anti-BCMA (16747P scFv) 2×10 ⁶ células	7,13E+05 ± 4,17E+04

Ejemplo 5: Las células T-CAR dirigidas a BCMA reducen el crecimiento de tumores que expresan BCMA (MOLP-8) *In Vivo* en un modelo de tumor xenogénico

5

Para determinar la eficacia *in vivo* de las células T del receptor de antígeno quimérico (CAR) dirigidas a BCMA, se realizó un estudio de tumor xenogénico en ratones utilizando células de mieloma múltiple humano MOLP-8, que expresan niveles bajos de BCMA.

- 10 *Implantación y medición de tumores xenogénicos:* El día 0, a ratones NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) inmunodeficientes se les administró por vía intravenosa 2 x 10⁶ células tumorales de mieloma múltiple humano MOLP-8 BCMA⁺ que se diseñaron para expresar también luciferasa de luciérnaga (células MOLP-8-luciferasa). El día 12, a los ratones se les inyectó por vía intravenosa 2×10⁶ células T que expresaban el CAR de control o un CAR anti-BCMA (según lo determinado por la frecuencia de las células que expresan GFP, que es un marcador de aquellas células
- 15 que han sido transducidas con CAR). Los ratones (n=5 por grupo) recibieron una administración de 2×10⁶ T CAR scFv irrelevantes (control scFv CAR), 2×10⁶ T CAR anti-BCMA que codifica el CAR scFv 21581 o 2×10⁶ T CAR anti-BCMA que codifica el scFv 16747. El crecimiento del tumor se evaluó durante todo el experimento midiendo la bioluminiscencia (BLI) tumoral en animales anestesiados. Como control positivo, un grupo de ratones (n=5) recibió únicamente células MOLP-8-luciferasa, pero no células T. Para medir los niveles de BLI de fondo, un grupo de ratones
- 20 (n=5) no recibió tratamiento y no recibió tumores ni células T.

Medición del crecimiento de tumores xenogénicos: Para medir la carga tumoral se utilizaron imágenes de BLI. Los ratones recibieron una inyección IP de 150 mg/kg del sustrato de luciferasa D-luciferina suspendido en PBS. Cinco minutos después de esta inyección, se tomaron imágenes de BLI de los ratones anestesiados con isoflurano usando el sistema Xenogen IVIS. La adquisición de imágenes se llevó a cabo con el campo de visión en D, a una altura del sujeto de 1,5 cm y un nivel de agrupación medio con un tiempo de exposición automático determinado por el programa informático Living Image. Las señales de las BLI se extrajeron utilizando el programa informático Living Image: se dibujaron regiones de interés alrededor de cada masa tumoral y se registraron las intensidades de los fotones como p/s/cm²/sr.

- 10 Mientras que los tumores de MOLT-8-luciferasa BCMA⁺ 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 la carga tumoral a niveles de fondo en todos los animales. Los resultados se muestran en la Tabla 6, a continuación.

Tabla 6: Tamaño promedio del tumor (por radiancia) en diferentes puntos temporales

T CAR Tratamiento	Radiancia [p/s/cm²/sr] 12 días después de la implantación (media ± ETM)
Sin tumor (BLI de fondo)	6,81E+05 ± 3,46E+04
Sin T CAR (control positivo)	1,51E+06 ± 7,81E+04
T CAR de control (scFv irrelevante) 2×10 ⁶ células	1,72E+06 ± 1,33E+05
CAR anti-BCMA (21581 scFv) 2×10 ⁶ células	1,46E+06 ± 1,01E+05
CAR anti-BCMA (16747 scFv) 2×10 ⁶ células	1,32E+06 ± 5,86E+04
T CAR Tratamiento	Radiancia [p/s/cm²/sr] 18 días después de la implantación (media ± ETM)
Sin tumor (BLI de fondo)	7,61E+05 ± 2,73E+04
Sin T CAR (control positivo)	2,01E+07 ± 8,14E+05
T CAR de control (scFv irrelevante) 2×10 ⁶ células	2,11E+07 ± 3,02E+06
CAR anti-BCMA (21581 scFv) 2×10 ⁶ células	5,37E+06 ± 9,01E+05
CAR anti-BCMA (16747 scFv) 2×10 ⁶ células	6,98E+06 ± 9,57E+05
T CAR Tratamiento	Radiancia [p/s/cm²/sr] 25 días después de la implantación (media ± ETM)
Sin tumor (BLI de fondo)	7,20E+05 ± 2,31E+04
Sin T CAR (control positivo)	5,93E+07 ± 7,71E+06
T CAR de control (scFv irrelevante) 2×10 ⁶ células	6,40E+07 ± 1,71E+07
CAR anti-BCMA (21581 scFv) 2×10 ⁶ células	7,50E+05 ± 4,63E+04
CAR anti-BCMA (16747 scFv) 2×10 ⁶ células	6,77E+05 ± 7,41E+04
T CAR Tratamiento	Radiancia [p/s/cm²/sr] 32 días después de la implantación (media ± ETM)
Sin tumor (BLI de fondo)	6,85E+05 ± 3,99E+04
Sin T CAR (control positivo)	Animales sacrificados
T CAR de control (scFv irrelevante) 2×10 ⁶ células	Animales sacrificados
CAR anti-BCMA (21581 scFv) 2×10 ⁶ células	6,28E+05 ± 3,75E+04
CAR anti-BCMA (16747 scFv) 2×10 ⁶ células	6,82E+05 ± 2,35E+04

Ejemplo 6: Las células T-CAR específicas de BCMA actúan como mediadoras en la citólisis de células que expresan BCMA

Células T CD3⁺ humanas se aislaron de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), se estimularon con microperlas CD3/CD28 y con 100 U/ml de IL-2 humana recombinante, y se transdujeron con el lentivirus a una MOI=5, como se ha indicado anteriormente en el Ejemplo 2. Las células transducidas se expandieron durante 3 semanas con

microperlas CD3/CD28 y con 100 U/ml de IL-2 humana recombinante antes de realizar un ensayo citolítico.

Para determinar la capacidad citolítica de las células T del receptor de antígeno quimérico (CAR) dirigidas a BCMA, se realizó un ensayo citolítico utilizando células T-CAR expandidas y diferentes líneas celulares tumorales diana que expresaban niveles variables de BCMA. El día 21 de expansión, las células T-CAR expandidas se cultivaron conjuntamente por triplicado en diferentes proporciones con líneas celulares diana BCMA+ marcadas con calceína. Cada línea celular diana se recogió y se resuspendió a una densidad de 2×10^6 /ml antes de añadir el colorante calceína-AM a una concentración de 8 uM durante 35 minutos a 37 °C. Después de marcar con calceína, las células diana se lavaron dos veces para eliminar el exceso de calceína. Seguidamente, las células T y las células diana se cultivaron conjuntamente en una placa de fondo redondo de 96 pocillos a diferentes proporciones y se cultivaron a 37 °C durante 2,5 horas cuando se recogió el sobrenadante del cultivo. Para un control negativo, las células diana se cultivaron conjuntamente con células T generadas utilizando un CAR similar diseñado para contener un scFv irrelevante que no reconoce el BCMA. Como control negativo CAR adicional, se utilizaron células T expandidas y no transducidas del mismo donante sano normal. Como control para la destrucción mediada por células T-CAR específicas de antígeno, se utilizó la línea celular diana K562 de leucemia mielógena crónica ya que esta línea celular es negativa para la expresión de BCMA. Para determinar si la calceína se liberaba 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 sometieron a lisis usando medio Optmizer que se complementó con Triton™ al 1 % y detergente X-114. Dentro del sobrenadante, los niveles relativos de calceína se midieron usando un lector de placas Viktor X4 y el porcentaje de citotoxicidad se calculó como ((señal de calceína - liberación espontánea de calceína)/(liberación máxima de calceína - liberación espontánea de calceína))*100.

Como se muestra en las Tablas 7A-7C, a continuación, los cultivos que consisten en células T CAR+ dirigidas a BCMA generadas utilizando scFv 21581 y 16747 indujeron una fuerte citólisis de células diana H-929 y 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 de antígeno BCMA que las células MOLP-8. Para cada cultivo de células T-CAR dirigidas a BCMA, el mayor grado de citotoxicidad se observó contra las células H-929, y las células T-CAR dirigidas a BCMA diseñadas con el scFv 16747 produjeron la mayor magnitud de citotoxicidad contra las dos líneas celulares diana. Cuando tanto las células T no transducidas como las expandidas (MOI 0), y las células T CAR irrelevantes (17363), se cultivan conjuntamente con células diana en una proporción máxima de 50 células T con respecto a una célula diana, no se logra suscitar ninguna citólisis de las células MOLP-8 y H-929 diana. Este resultado ilustra que la citólisis solo se observa cuando la estructura de CAR contiene el scFv que reconoce a BCMA (por ejemplo, de mAb21581 y mAb16747). Por añadidura, 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 para que se observe citólisis se requiere la expresión de BCMA.

Tabla 7A: Citólisis de células T-CAR dirigidas a BCMA

Proporción de células T efectoras: células diana	Célula T-CAR / Célula diana							
	21581 / MOLP8		21581 / H929		16747 / MOLP8		16747 / H929	
	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE
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

DE: desviación estándar

Tabla 7B: Citólisis de células T-CAR dirigidas a BCMA

Proporción de células T efectoras: células diana	Célula T-CAR / Célula diana							
	17363 HPV16 / MOLP8		17363 HPV16 / H929		21581 / K562		16747 / K562	
	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE
50	-3,1	1,7	-0,8	1,2	2,0	1,1	3,5	1,4

DE: desviación estándar

Tabla 7C: Citólisis de células T-CAR dirigidas a BCMA

Proporción de células T efectoras: células diana	Célula T-CAR / Célula diana			
	Células T CAR Neg / MOLP8		Células T CAR Neg / H929	
	media	DE	media	DE
50	-1,4	2,0	-0,5	1,5

DE: desviación estándar

Ejemplo 7: Citotoxicidad *ex vivo* de células T-CAR dirigidas a BCMA en la médula ósea procedente de pacientes con mieloma múltiple

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

En el momento de la recogida, las células T-CAR en expansión se lavaron y resuspendieron en medio completo (RPMI complementado con FBS al 10 %, penicilina 100 U/ml, 100 µg/ml de estreptomicina y 292 µg/ml de L-glutamina). La médula ósea de pacientes con mieloma múltiple se descongeló y se resuspendió en medio completo. Se sembraron células estromales HS-5 en placas de fondo plano de 96 pocillos a razón de 10.000 células por pocillo y se incubaron durante la noche. A los pocillos que contenían las células estromales se añadieron células T y médula ósea procedentes del paciente a diferentes proporciones de E:D (E=célula efectora/D=célula diana) (doble titulación comenzando a una E:D=10:1) y se cultivaron a 37 °C durante 12 horas. Como control negativo CAR, se utilizaron células T expandidas y no transducidas del mismo donante sano normal.

Después de 12 horas, la supervivencia de los blastos de mieloma múltiple se determinó mediante citometría de flujo. Las células se tiñeron con un cóctel 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 fijable LIVE/DEAD durante 20-30 minutos a 4 °C, seguido de dos lavados en PBS y se resuspendieron en tampón Miltenyi AutoMacs frío. Se añadieron perlas CountBright a las muestras para cuantificar el recuento celular absoluto por pocillo. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo BD FortessaX20. Los blastos de mieloma múltiple supervivientes se clasificaron como CD4-/CD8-/SlamF7+/CD138+ sencillos y vivos. El porcentaje de supervivencia se calculó como el recuento absoluto de blastos de mieloma múltiple vivos en la muestra tratada normalizada para células vivas de mieloma múltiple en el control no tratado.

Los cultivos que consisten en células T CAR+ dirigidas a BCMA generadas utilizando el mAb21581 VH/VL indujeron una fuerte citólisis específica de diana de blastos de mieloma múltiple de 2 pacientes recién diagnosticados y de 1 paciente en recidiva. A una proporción de E:D de 10:1, se produjo la lisis del 87-94 % de los blastos de mieloma múltiple. Las células T no transducidas y expandidas (MOI 0) produjeron la lisis del 34-0 % de los blastos de mieloma múltiple. Este resultado demuestra la capacidad de las células T CAR+ dirigidas a BCMA para causar fuertemente la lisis de blastos de mieloma múltiple procedentes del paciente de una manera específica de diana. Los resultados se muestran en la Tabla 8, a continuación.

Tabla 8: % de supervivencia de blastos de mieloma múltiple en citólisis de células T-CAR dirigidas a BCMA

ID de la muestra	MM453		MM511		MM455	
Cuadro clínico	recién diagnosticado		recién diagnosticado		en recidiva	
% de blastos de MM	25 %		38 %		90 %	
BCMA ABC en MM	12302		2631		46925	
Proporción 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

REIVINDICACIONES

1. Un receptor de antígeno quimérico específico del antígeno de maduración de células B (BCMA) que comprende, del extremo N al extremo C:

- (a) un dominio de unión a ligando extracelular que comprende un dominio de unión a antígeno anti-BCMA;
 - (b) una bisagra de CD8;
 - (c) un dominio transmembrana de CD8; y
 - (d) un dominio citoplasmático que comprende un dominio coestimulador de 4-1BB y un dominio de señalización de CD3zeta;
- en donde el dominio de unión a ligando extracelular es un dominio de fragmento variable monocatenario (scFv) anti-BCMA que comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) y una región variable de cadena pesada (HCVR) unidas por un enlazador,
- en donde la LCVR comprende los dominios LCDR1-LCDR2-LCDR3 expuestos en las SEQ ID NO: 60-62-64, respectivamente, y la HCVR comprende los dominios HCDR1-HCDR2-HCDR3 expuestos en las SEQ ID NO: 52-54-56, respectivamente.

2. El receptor de antígeno quimérico de la reivindicación 1, en donde el enlazador comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 93-96.

3. El receptor de antígeno quimérico de la reivindicación 1 o 2, en donde la LCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58 y la HCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50.

4. El receptor de antígeno quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde:

- (a) la bisagra comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97;
- (b) el dominio transmembrana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98;
- (c) el dominio coestimulador comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 99; o
- (d) el dominio de señalización comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 100.

5. El receptor de antígeno quimérico de la reivindicación 1, en donde el receptor de antígeno quimérico comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 88.

6. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el receptor de antígeno quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, opcionalmente en donde la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 87.

7. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 6, opcionalmente en donde el vector es un vector de ADN, un vector de ARN, un plásmido, un vector lentivírico, un vector adenovírico o un vector retrovírico.

8. Una célula que comprende una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 6 o un vector de la reivindicación 7, opcionalmente en donde la célula es una célula T humana.

9. Una célula diseñada que comprende un receptor de antígeno quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.

10. La célula diseñada de la reivindicación 9, en donde:

- (a) la célula diseñada es una célula inmunitaria;
- (b) la célula diseñada es una célula inmunitaria y la célula inmunitaria es una célula inmunoefectora;
- (c) la célula diseñada es un linfocito T; o
- (d) la célula diseñada es un linfocito T y el linfocito T es un linfocito T inflamatorio, un linfocito T citotóxico, un linfocito T regulador o un linfocito T auxiliar, opcionalmente un linfocito T citotóxico CD8+.

11. Una población de células diseñadas, que puede obtenerse:

- (a) proporcionando una población de células inmunitarias, que se hayan obtenido de un sujeto;
- (b) introduciendo las células inmunitarias en una molécula de ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5;
- (c) cultivando las células inmunitarias en condiciones que expresen las moléculas de ácido nucleico; y
- (d) aislando las células inmunitarias que expresan el receptor de antígeno quimérico en la superficie de las células.

12. Una composición farmacéutica que comprende uno de:

- (a) una célula T humana modificada genéticamente y un portador farmacéuticamente aceptable, en donde la célula T humana modificada genéticamente comprende un receptor de antígeno quimérico de acuerdo con una cualquiera

de las reivindicaciones 1-5; o

(b) una célula diseñada de acuerdo con la reivindicación 9 y un portador farmacéuticamente aceptable; o

(c) una célula diseñada de acuerdo con la reivindicación 10 y un portador farmacéuticamente aceptable.

5 13. La célula diseñada de la reivindicación 10, o la población de células diseñadas de la reivindicación 11, para su uso en el tratamiento de un cáncer que expresa BCMA en un sujeto, preferentemente un sujeto humano, proporcionando inmunidad antitumoral en el sujeto, en donde las células se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz para

(a) mejorar la actividad de los linfocitos T en el sujeto receptor, o (b) estimular una respuesta inmunitaria mediada por células T en una población de células o tejidos diana en el sujeto receptor.

10 14. Las células diseñadas o la población de células diseñadas para el uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el cáncer es 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.

15 15. Un método de diseño de una población de células que expresen un receptor de antígeno quimérico, que comprende:

20 (a) proporcionar una población de células inmunitarias, que opcionalmente se hayan obtenido de un sujeto;
 (b) introducir en las células inmunitarias una molécula de ácido nucleico que codifique un receptor de antígeno quimérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5;
 (c) cultivar las células inmunitarias en condiciones que expresen la molécula de ácido nucleico; y
 (d) aislar las células inmunitarias que expresan el receptor de antígeno quimérico en la superficie de las células.

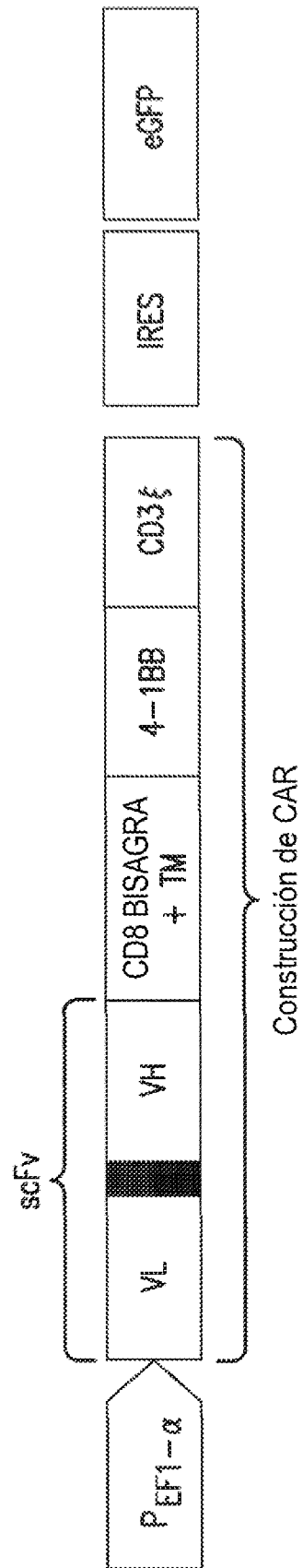


FIG.1