

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 971 033**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 14/725 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.08.2020 PCT/EP2020/071831**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.02.2021 WO21023721**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.08.2020 E 20757544 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.10.2023 EP 4007777**

54 Título: **Células CAR-T contra BCMA para el tratamiento de mieloma múltiple**

30 Prioridad:

02.08.2019 EP 19382673

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

03.06.2024

73 Titular/es:

**FUNDACIÓ DE RECERCA CLÍNIC BARCELONA-
INSTITUT D'INVESTIGACIONS BIOMÈDIQUES
AUGUST PI I SUNYER (FRCB-IDIBAPS) (33.3%)
C/Rosselló 149-153
08036 Barcelona, ES;
HOSPITAL CLÍNIC DE BARCELONA (33.3%) y
UNIVERSITAT DE BARCELONA (33.3%)**

72 Inventor/es:

**MARTÍN ANTONIO, BEATRIZ;
URBANO ISPIZUA, ÁLVARO;
PÉREZ AMILL, LORENA;
SUÑE RODRIGUEZ, GUILLERMO y
JUAN OTERO, MANEL**

74 Agente/Representante:

BERTRÁN VALLS, Silvia

Observaciones:

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

ES 2 971 033 T3

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

DESCRIPCIÓN

Células CAR-T contra BCMA para el tratamiento de mieloma múltiple

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención proporciona productos terapéuticos para el tratamiento de mieloma múltiple. En particular, la presente invención proporciona células T con receptor de antígeno quimérico (CAR) que pueden seleccionar como diana el antígeno de maduración de células B.

10

Antecedentes de la invención

El mieloma múltiple (MM) sigue siendo una neoplasia maligna hematológica incurable responsable del 1 % de todos los cánceres y del 15-20 % de todas las neoplasias malignas hematológicas, con un aumento promedio del 0,8 % de casos nuevos cada año durante la última década. El MM se caracteriza por la expansión clonal de células plasmáticas malignas en la médula ósea (MO), lo que conduce a una producción excesiva de inmunoglobulina (Ig) monoclonal en sangre y/u orina, provocando lesiones osteolíticas con síntomas clínicos asociados que incluyen hipercalcemia, infecciones y disfunción orgánica. La historia natural del MM es la recaída hasta la enfermedad resistente al tratamiento sin alcanzar una meseta de supervivencia, logrando menos del 10 % de los pacientes una remisión completa (CR) sostenida más allá de 5-10 años después del trasplante de células madre autólogas (ASCT). Además, los pacientes rara vez se curan después de quimioterapia a dosis altas seguida de ASCT y, lo que es más importante, los pacientes que logran la CR tienen una supervivencia más larga que aquellos que no obtienen la CR. Por tanto, se requieren nuevas estrategias para mejorar la supervivencia de los pacientes con MM R/R, especialmente en pacientes de alto riesgo, con citogenética adversa.

25

En los últimos años, la inmunoterapia de células T con receptor de antígeno quimérico (CAR), basada en la infusión de células T autólogas modificadas genéticamente para reconocer un antígeno expresado en la célula tumoral, ha cambiado la modalidad de tratamiento de determinadas neoplasias malignas hematológicas. Específicamente, en la leucemia linfoblástica aguda (LLA) y los linfomas, este tratamiento mediante la selección como diana de CD19, ha logrado respuestas sobresalientes que condujeron a la aprobación por parte de la FDA de estos nuevos tratamientos. En MM, el antígeno de maduración de células B (BCMA), una glicoproteína transmembranaria implicada en la regulación de la maduración y supervivencia de las células B, con expresión específica y restringida en células B maduras y plasmáticas, ha aparecido como la diana más prometedora para la inmunoterapia con células CART.

35

Todos los estudios clínicos en curso en pacientes con MM con células CARTBCMA han demostrado que, en comparación con CART19, se requiere una dosis más alta de células CART para lograr respuestas, siendo 150×10^6 de células CART la dosis más baja requerida para obtener una respuesta. Además, se ha demostrado que con el tiempo se obtiene una profundización de la respuesta a medida que el número de respuestas parciales muy buenas evoluciona hacia respuestas completas con el tiempo. Además, con el objetivo de evitar recaídas por desaparición temprana de las células CART, el uso de CAR humanizados o humanos en lugar de CAR murinos está surgiendo como tendencia actual en la inmunoterapia con células CART (Sommermeier D, Hill T, Shamah SM, *et al.* Fully human CD19-specific chimeric antigen Receptors for T-cell therapy. *Leukemia*. 2017;31(10):2191-2199; Turtle CJ, Hanafi LA, Berger C, *et al.* CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. *J Clin Invest*. 2016;126(6):2123-2138).

40

45

Los documentos WO2017211900, CN108395478, CN108285489, CN108004259 divulgan células CART contra BCMA basadas en el anticuerpo J22.9 y variantes del mismo.

50

En este caso, partiendo de un CART19 (ARI1) que ya se está usando en un ensayo clínico multicéntrico de fase II para neoplasias malignas de células B (Castella M, Boronat A, Martín-Ibáñez R, Rodríguez V, Sune G, Caballero M, *et al.* Development of a Novel Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor: A Paradigm for an Affordable CAR T Cell Production at Academic Institutions. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2019 15 de marzo;12:134-44), se generaron células CART murinas contra BCMA (ARI2m) que podrían ser usadas por pacientes en un sistema de salud público. Una vez que se confirmó su eficacia *in vitro* e *in vivo*, ARI2m se humanizó para dar ARI2h. Se compararon la eficacia y la respuesta inflamatoria de ARI2m y ARI2h, mostrando que ambos CAR tenían una eficacia comparable y se observó un perfil inflamatorio más bajo para ARI2h. Además, la expansión a escala clínica de BPF se ha logrado con éxito en la institución de los presentes inventores para ambas CAR. Finalmente, se analizó el impacto de BCMA soluble (sBCMA) en la actividad de ARI2, demostrando cómo sBCMA puede afectar negativamente a la actividad de CART. Todos estos resultados permitirán la realización de un ensayo clínico multicéntrico para pacientes con MM con las células ARI2h de la presente invención en España.

55

60

Breve descripción de las figuras

65 **Figura 1:** Diseño y caracterización funcional de una CARTBCMA murina (ARI2m) frente a células de mieloma múltiple (MM). (A) Diseño de ARI2m. (B) Eficiencia de transducción de células T ARI2 y NT antes y después de la

crioconservación. (C) Ensayos de citotoxicidad de ARI2 contra dos líneas celulares de MM (ARP1 y U266) y una línea celular distinta de mieloma (K562). Ensayo de citotoxicidad por dilución limitante contra ARP1 y U266 (líneas celulares de MM) y K562 (CML) realizado en razones de desde 1:1 hasta 0,125,1 (célula T: línea celular tumoral) a las 36 h (D) y a las 72 h (E). (F) Perfil de citocinas de IFN γ , IL-6 y TNF- α después de 24 h y 48 h de cultivo conjunto (células T y células ARP1). (G-K) Eficacia *in vivo* de las células ARI2m: (G): Diagrama de diseño experimental y cuantificación de la progresión de la enfermedad por bioluminiscencia semanal (H) y supervivencia global de ratones tratados con ARI2m frente al grupo de células T NT frente al grupo no tratado (I). (J) Citometría de flujo de médula ósea (MO) y bazo de ratones al final del experimento. (K) Porcentaje de células T totales y células CART en MO y bazo en ratones tratados con ARI2m. (L). ELISA de BCMA soluble (sBCMA) a partir de suero de ratón después de tratarse con células T ARI2m o NT.

Figura 2: Humanización de ARI2m para dar ARI2h y comparación de ARI2m frente a ARI2h: (A) Representación esquemática de la disparidad de aminoácidos para las cadenas pesada y ligera de scFv en ARI2 humanizado basada en algoritmos BLAST o línea germinal. (B) Ensayo de citotoxicidad por dilución limitante de ARI2m frente a ambas versiones humanizadas (Blast y línea germinal). (C) Ensayo citotóxico a largo plazo que compara ARI2 murino frente a humanizado contra ARP1 (MM) y K562 (CML) y su producción de IFN γ . (D-I) Resultados *in vivo*: progresión de la enfermedad por bioluminiscencia semanal en el modelo temprano (D) y modelo avanzado (E) y su cuantificación respectivamente (F). (G) Curva de Kaplan-Meier que representa la supervivencia global del grupo de ratones de ARI2m y ARI2h no tratados en modelos de enfermedad temprano y avanzado. (H) Total de células T CD3+ y porcentaje de células ARI2 de la población de células T CD3+ encontradas en la MO y el bazo para modelos de enfermedad tanto temprano como avanzado. (I) ELISA de IFN γ a partir de sueros de ratón los días 3 y 31 para el modelo de enfermedad temprano y los días 5 y 21 para el modelo de enfermedad avanzado.

Figura 3: Perfil de células T y respuesta inflamatoria de ARI2m frente a ARI2h: (A) Esquema del ensayo repetido de estimulación antigénica. (B) Perfil de razón de células T CD4/CD8 de células T ARI2m, ARI2h y NT a lo largo de 4 exposiciones consecutivas y porcentaje de células CART en subconjuntos de células T CD4 o CD8 (C). (D) Representación esquemática de monocitos autólogos y aislamiento de células T de la misma capa leucocitaria y su expansión, diferenciación y cultivo conjunto con líneas celulares de MM. (E) Citotoxicidad y producción de citocinas proinflamatorias (IL6, TNF α e IL1 β) (F) de células ARI2m contra células ARP1 con o sin macrófagos. (G) Producción de citocinas durante 48 h de IFN γ , IL6, TNF α e IL1 β después del cultivo conjunto de ARI2m/ARI2h con macrófagos y ARP1.

Figura 4: Producción clínica y actividad de ARI2m y ARI2h: expansión clínica de las células ARI2m y ARI2h (A y B) que muestra el total de células T logradas al final de la expansión (izquierda) y el porcentaje de células CART logradas (derecha). (C) Mediana de cuatro expansiones clínicas de células ARI2m y ARI2h. Los resultados muestran el porcentaje y el número total de células ARI2 logradas al final de la expansión. (D) Ensayos de citotoxicidad contra la línea celular U266 de MM de células ARI2m y ARI2h al final de la expansión.

Figura 5: El BCMA soluble afecta a la actividad de ARI2: (A) ELISA de sBCMA de 5 pacientes con gammapatía monoclonal de significado indeterminado (MGUS), MM en el momento del diagnóstico (Dx) y en el momento de la recaída. (B) Imagen de fluorescencia confocal donde las células de MM se tiñeron con el rastreador celular CMAC y tinción de BCMA con un anticuerpo monoclonal anti-TNRSF17. (C y D) Imágenes representativas de dos experimentos de lapso de tiempo *in vivo* diferentes durante tres horas de ARI2m teñidas con el rastreador celular CMAC y células ARP1 de MM que sobreexpresan BCMA en GFP. (E) Ensayo de citotoxicidad y producción de IFN γ (F) de ARI2m cultivada conjuntamente con células ARP1 de MM, añadiendo proteína BCMA recombinante (BCMA) con y sin un anticuerpo contra BCMA (Ac). (G) MFI de BCMA de la línea celular ARP1 de MM sola o en cultivo conjunto con células T ARI2/NT con o sin DAPT y su cuantificación de sBCMA (H). (I) Esquema de ensayos citotóxicos con y sin Transwell (TW). El cultivo conjunto de células T ARI2m/NT con la línea celular ARP1 se realiza en el pocillo y se añaden células ARP1 adicionales en el TW como fuente para la liberación continua de sBCMA. En paralelo también se añadió DAPT. (J) Resultados citotóxicos del experimento mostrado en (I).

Figura 6: Comparación adicional de ARI2m frente a ARI2h en un modelo de enfermedad muy avanzado. (A) Ensayo CFSE durante 4 días para analizar la proliferación de ARI2 después de encontrar células ARP1 de MM. (B) Producción de TNF α e IL6 durante 7 días de cultivo conjunto de células ARI2m y ARI2h con células ARP1 de MM en una razón de 0,125:1 (E:T). (C) Representación esquemática del experimento *in vivo* en ratones que reciben células ARP1 de MM y células ARI2m y ARI2h. (D) Progresión de la enfermedad seguida de bioluminiscencia semanal del experimento en (C).

Descripción detallada de la invención

Definiciones

“Administrar” o “administración de” un medicamento a un paciente (y equivalentes gramaticales de esta frase) se refiere a la administración directa, que puede ser la administración a un paciente por un profesional médico o puede ser autoadministración y/o administración indirecta, que puede ser el acto de prescribir un medicamento. Por

ejemplo, un médico que indica a un paciente que se autoadministre un medicamento o le proporciona una receta para un medicamento está administrando el medicamento al paciente.

5 El término "Affibody" se refiere a una proteína que se deriva del dominio Z de la proteína A y que se ha modificado por ingeniería para unirse a una diana específica (véase Frejd y Kim, 2017. *Exp Mol Med.* 49(3): e306).

10 El término "anticuerpo" se refiere a una molécula que comprende al menos un dominio de inmunoglobulina que se une a una diana particular o es inmunológicamente reactiva con ella. El término incluye anticuerpos completos y cualquier porción de unión a antígeno o cadenas individuales de los mismos y combinaciones de los mismos; por ejemplo, el término "anticuerpo" en particular incluye anticuerpos bivalentes y anticuerpos biespecíficos bivalentes.

Un tipo típico de anticuerpo comprende al menos dos cadenas pesadas ("HC") y dos cadenas ligeras ("LC") interconectadas por enlaces disulfuro.

15 Cada "cadena pesada" comprende un "dominio variable de cadena pesada" (abreviado en el presente documento como "VH") y un "dominio constante de cadena pesada" (abreviado en el presente documento como "CH"). El dominio constante de cadena pesada normalmente comprende tres dominios constantes, CH1, CH2 y CH3.

20 Cada "cadena ligera" comprende un "dominio variable de cadena ligera" (abreviado en el presente documento como "VL") y un "dominio constante de cadena ligera" ("CL"). El dominio constante de cadena ligera (CL) puede ser de tipo kappa o de tipo lambda. Los dominios VH y VL pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad ("CDR"), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas "regiones de entramado" ("FW").

25 Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FW, dispuestas desde el extremo amino-terminal hasta el extremo carboxilo-terminal en el siguiente orden: FW1, CDR1, FW2, CDR2, FW3, CDR3, FW4. La presente divulgación, entre otras cosas, presenta secuencias VH y VL, así como las subsecuencias correspondientes a CDR1, CDR2 y CDR3.

30 Los límites precisos de la secuencia de aminoácidos de una CDR determinada pueden determinarse usando cualquiera de varios esquemas bien conocidos, incluyendo los descritos por Kabat *et al.* (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (esquema de numeración "Kabat"), Al-Lazikani *et al.*, (1997) *JMB* 273,927-948 (esquema de numeración "Chothia").

35 Por consiguiente, un experto en la técnica entendería que las secuencias de FW1, FW2, FW3 y FW4 están igualmente divulgadas. Para un VH particular, FW1 es la subsecuencia entre el extremo N-terminal del VH y el extremo N-terminal de H-CDR1, FW2 es la subsecuencia entre el extremo C-terminal de H-CDR1 y el extremo N-terminal de H-CDR2, FW3 es la subsecuencia entre el extremo C-terminal de H-CDR2 y el extremo N-terminal de H-CDR3, y FW4 es la subsecuencia entre el extremo C-terminal de H-CDR3 y el extremo C-terminal de VH. De manera similar, para un VL particular, FW1 es la subsecuencia entre el extremo N-terminal de VL y el extremo N-terminal de L-CDR1, FW2 es la subsecuencia entre el extremo C-terminal de L-CDR1 y el extremo N-terminal de L-CDR2. FW3 es la subsecuencia entre el extremo C-terminal de L-CDR2 y el extremo N-terminal de L-CDR3, y FW4 es la subsecuencia entre el extremo C-terminal de L-CDR3 y el extremo C-terminal de VL.

45 Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera contienen una región que interactúa con una diana de unión, y esta región que interactúa con una diana de unión también se denomina "sitio de unión a antígeno" o "sitio que se une al antígeno" en el presente documento. Los dominios constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión del anticuerpo a tejidos o factores del huésped, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico. Los anticuerpos a modo de ejemplo de la presente divulgación incluyen anticuerpos típicos, pero también fragmentos bivalentes y variaciones de los mismos, tales como un F(ab')₂.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" abarca anticuerpos policlonales intactos, anticuerpos monoclonales intactos, fragmentos de anticuerpos bivalentes (tales como F(ab')₂), anticuerpos multiespecíficos tales como anticuerpos biespecíficos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de unión a antígeno.

60 Un anticuerpo puede ser de cualquiera de las cinco clases principales (isotipos) de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, o subclases de las mismas (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2), basándose en la identidad de sus dominios constantes de cadena pesada denominados alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las diferentes clases de inmunoglobulinas tienen estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales diferentes y bien conocidas. Los anticuerpos pueden estar desnudos o conjugados con otras moléculas, tales como agentes terapéuticos o agentes de diagnóstico, para formar inmunoconjugados.

65 El término "fragmento de unión a antígeno" o "Fab" se refiere a un fragmento de anticuerpo que comprende un dominio constante y uno variable de cada una de las cadenas pesada y ligera. Puede obtenerse un fragmento Fab

dirigiendo un anticuerpo monoclonal intacto con papaína.

El término “mieloma múltiple”, también conocido como mieloma de células plasmáticas, es un cáncer de células plasmáticas, un tipo de glóbulo blanco que normalmente produce anticuerpos. A menudo, inicialmente no se notan síntomas. Cuando está avanzado, puede producirse dolor de huesos, sangrado, infecciones frecuentes y anemia. Las complicaciones pueden incluir amiloidosis.

El término “antígeno de maduración de células B” (BCMA o BCM), también conocido como miembro 17 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFRSF17), es una proteína que en los humanos está codificada por el gen TNFRSF17.

El término “resto que selecciona como diana BCMA” se refiere a una sustancia que es capaz de unirse a BCMA. Dentro del contexto de un CAR, un resto que selecciona como diana BCMA dirige células T a una célula positiva para BCMA, preferiblemente una célula cancerosa. Dentro del contexto de un CAR, debe entenderse que el resto que selecciona como diana BCMA es genéticamente codificable.

El término “receptor de antígeno quimérico” o “CAR” se refiere a un receptor sintético que dirige células T a un antígeno elegido y reprograma la función, el metabolismo y la persistencia de las células T (véase Rivière y Sadelain, 2017. *Mol Ther.* 25(5):1117-1124). De manera similar, el término “CART” se refiere a una célula T que comprende un CAR.

“Terapia combinada”, “en combinación con” o “junto con”, tal como se usa en el presente documento, denota cualquier forma de tratamiento concurrente, paralelo, simultáneo, secuencial o intermitente con al menos dos modalidades de tratamiento distintas (es decir, compuestos, componentes, agentes seleccionados como diana o agentes terapéuticos). Como tal, los términos se refieren a la administración de una modalidad de tratamiento antes, durante o después de la administración de la otra modalidad de tratamiento al sujeto. Las modalidades en combinación pueden administrarse en cualquier orden. Las modalidades terapéuticamente activas se administran juntas (por ejemplo, simultáneamente en las mismas composiciones, formulaciones o formas farmacéuticas unitarias o separadas) o por separado (por ejemplo, en el mismo día o en días diferentes y en cualquier orden según un protocolo de dosificación apropiado para las composiciones, formulaciones o formas de dosificación unitarias separadas) de una manera y régimen de dosificación prescritos por un cuidador médico o según una agencia reguladora. En general, cada modalidad de tratamiento se administrará en una dosis y/o en un horario determinado para esa modalidad de tratamiento. Opcionalmente, pueden usarse tres o más modalidades en una terapia combinada. Además, las terapias combinadas proporcionadas en el presente documento pueden usarse junto con otros tipos de tratamiento. Por ejemplo, puede seleccionarse otro tratamiento contra el cáncer del grupo que consiste en quimioterapia, cirugía, radioterapia (radiación) y/o terapia hormonal, entre otros tratamientos asociados con el tratamiento habitual actual para el sujeto.

Una “respuesta completa” o “remisión completa” o “CR” indica la desaparición de todas las lesiones diana tal como se define en los criterios RECIST v1.1. Esto no siempre significa que el cáncer se haya curado.

El término “dominio de señalización coestimulador” se refiere a un resto de señalización que proporciona a las células T una señal que, además de la señal primaria proporcionada por, por ejemplo, la cadena CD3 ζ del complejo TCR/CD3, media en una respuesta de células T, que incluye, pero no se limita a, activación, proliferación, diferenciación, secreción de citocinas y similares. Un dominio coestimulador, en el contexto de la presente invención, es 4-1BB. El término “4-1BB” se refiere a una proteína receptora de membrana también denominada CD137, que es un miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) expresado en la superficie de las células T activadas como un tipo de molécula accesoria [Kwon *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1963 (1989); PoUok *et al.*, *J. Immunol.* 151:771 (1993)]. 4-1BB tiene un peso molecular de 55 kDa y se encuentra como un homodímero. Se ha sugerido que 4-1BB media en una ruta de transducción de señales desde el exterior de la célula hacia el interior [Kim *et al.*, *J. Immunol.* 151:1255 (1993)]. Se aisló un gen de 4-1BB humano de una biblioteca de ADNc elaborada a partir de ARNm de células T periféricas humanas activadas [Goodwin *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 23:2631 (1993)]. La secuencia de aminoácidos de 4-1BB humano muestra un 60 % de homología con 4-1BB de ratón [Kwon *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1963 (1989); n.º de Gen Bank: NM_011612] lo que indica que las secuencias están altamente conservadas. Tal como se mencionó anteriormente, 4-1BB pertenece a la superfamilia TNFR, junto con CD40, CD27, TNFR-I, TNFR-II, Fas y CD30 [Alderson *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 24:2219 (1994)]. Cuando un anticuerpo monoclonal se une a 4-1BB expresado en la superficie de las células T, la activación de las células T anti-CD3 aumenta muchas veces [Pollok *et al.*, *J. Immunol.* 150:771 (1993)]. 4-1BB se une a un ligando de alta afinidad (4-1BBL, también denominado CD137L) expresado en varias células presentadoras de antígenos, tales como macrófagos y células B activadas [Pollok *et al.*, *J. Immunol.* 150:771 (1993); Schwarz *et al.*, *Blood* 85:1043 (1995)]. 4-1BBL se reivindica y describe en la patente estadounidense 5.674.704. La interacción de 4-1BB y su ligando proporciona una señal coestimuladora que conduce a la activación y el crecimiento de las células T [Goodwin *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 23:2631 (1993); Alderson *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 24:2219 (1994); Hurtado *et al.*, *J. Immunol.* 155:3360 (1995); Pollock *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 25:488 (1995); DeBenedette *et al.*, *J. Exp. Med.* 181:985 (1995)].

La "supervivencia libre de enfermedad" (DFS) se refiere al periodo de tiempo durante y después del tratamiento que el paciente permanece libre de enfermedad.

Tal como se usa en el presente documento, el término "cantidad eficaz" de un agente, por ejemplo, un agente terapéutico tal como una CART, es esa cantidad suficiente para efectuar resultados beneficiosos o deseados, por ejemplo, resultados clínicos y, como tal, una "cantidad eficaz" depende del contexto en el que se aplica. Por ejemplo, en el contexto de la administración de un agente terapéutico que trata el mieloma múltiple, una cantidad eficaz puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño o la carga del tumor; inhibir (es decir, retardar hasta cierto punto y, en una determinada realización, detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, retardar hasta cierto punto y, en una determinada realización, detener) la metástasis tumoral; inhibir, hasta cierto punto, el crecimiento tumoral; aliviar, hasta cierto punto, uno o más de los síntomas asociados con el cáncer; y/o dar como resultado una respuesta favorable, tal como un aumento de la supervivencia libre de progresión (PFS), la supervivencia libre de enfermedad (DFS) o la supervivencia global (OS), la respuesta completa (CR), la respuesta parcial (PR) o, en algunos casos, enfermedad estable (SD), una disminución de la enfermedad progresiva (PD), un tiempo reducido hasta la progresión (TTP) o cualquier combinación de los mismos. El término "cantidad eficaz" puede usarse de manera intercambiable con "dosis eficaz", "cantidad terapéuticamente eficaz" o "dosis terapéuticamente eficaz".

Los términos "individuo", "paciente" o "sujeto" se usan de manera intercambiable en la presente solicitud para designar a un ser humano y no se pretende que sean limitativos de ninguna manera. El "individuo", "paciente" o "sujeto" puede ser de cualquier edad, sexo y condición física.

"Infusión" o "infundir" se refiere a la introducción en el cuerpo de una disolución que contiene un agente terapéutico a través de una vena con fines terapéuticos. Generalmente, esto se logra mediante una bolsa intravenosa.

"Dominio de señalización intracelular", tal como se usa en el presente documento, se refiere a todo o una parte de uno o más dominios de una molécula (en este caso, la molécula receptora quimérica) que proporciona la activación de un linfocito. Los dominios intracelulares de tales moléculas median en una señal al interactuar con mediadores celulares para dar lugar a proliferación, diferenciación, activación y otras funciones efectoras. Los ejemplos de dominios de señalización intracelulares para su uso en un CAR de la invención incluyen las secuencias intracelulares de la cadena CD3 ζ y/o correceptores que actúan en conjunto para iniciar la transducción de señales después del acoplamiento al CAR, así como cualquier derivado o variante de estas secuencias, y cualquier secuencia sintética que tenga la misma capacidad funcional.

El término "monocuerpo" se refiere a una proteína que se deriva de un dominio de fibronectina tipo III que se ha modificado por ingeniería para unirse a una diana específica (véase Koide *et al.*, 2013. *J Mol Biol.* 415(2):393-405).

El término "nanocuerpo" se refiere a una proteína que comprende el dominio V de unión a antígeno único soluble de un anticuerpo de cadena pesada, preferiblemente un anticuerpo de cadena pesada de camélido (véase Bannas *et al.*, 2017. *Front Immunol.* 8:1603).

La "supervivencia global" (OS) se refiere al tiempo transcurrido desde la inscripción del paciente hasta la muerte o censurada en la última fecha en la que se sabía que estaba vivo. La OS incluye una prolongación de la esperanza de vida en comparación con individuos o pacientes sin tratamiento previo o sin tratar. La supervivencia global se refiere a la situación en la que un paciente permanece vivo durante un periodo de tiempo definido, tal como un año, cinco años, etc., por ejemplo, desde el momento del diagnóstico o tratamiento.

Una "respuesta parcial" o "PR" se refiere a al menos una disminución del 30 % en la suma de los diámetros de las lesiones diana, tomando como referencia el diámetro total inicial, en respuesta al tratamiento, tal como se define en los criterios RECIST v1.1.

El término "aptámero peptídico" se refiere a una secuencia corta de 5-20 residuos de aminoácidos que puede unirse a una diana específica. Los aptámeros peptídicos normalmente se insertan dentro de una región de bucle de una estructura proteica estable (véase Reverdatto *et al.*, 2015. *Curr Top Med Chem.* 15(12):1082-101).

Tal como se usa en el presente documento, "portador farmacéuticamente aceptable" o "diluyente farmacéuticamente aceptable" significa todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Los portadores, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas y, sin limitar el alcance de la presente invención, incluyen: agentes de tamponamiento adicionales; conservantes; codisolventes; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; agentes quelantes tales como EDTA; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); polímeros biodegradables, tales como poliésteres; contraiones formadores de sales, tales como sodio, alcoholes de azúcar polihídricos; aminoácidos, tales como alanina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, lisina, ornitina, leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico y treonina; azúcares orgánicos o alcoholes de azúcar, tales como lactitol,

estaquiosa, manosa, sorbosa, xilosa, ribosa, ribitol, mioininitosa, mioininitol, galactosa, galactitol, glicerol, ciclitoles (por ejemplo, inositol), polietilenglicol; agentes reductores que contienen azufre, tales como urea, glutatión, ácido tióctico, tioglicolato de sodio, tioglicerol, α -monotioglicerol y tiosulfato de sodio; proteínas de bajo peso molecular, tales como albúmina sérica humana, albúmina sérica bovina, gelatina u otras inmunoglobulinas; y polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona. Otros portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables, tales como los descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980) también pueden incluirse en una composición farmacéutica descrita en el presente documento, siempre que no afecten negativamente a las características deseadas de la composición farmacéutica.

"Enfermedad progresiva" o "enfermedad que ha progresado" se refiere a la aparición de una nueva lesión o tumor adicional y/o la progresión inequívoca de lesiones existentes no diana tal como se define en los criterios RECIST v1.1. Enfermedad progresiva o enfermedad que ha progresado también puede referirse a un crecimiento tumoral de más del 20 por ciento desde que comenzó el tratamiento, debido a un aumento o bien en la masa o bien en la diseminación del tumor.

La "supervivencia libre de progresión" (PFS) se refiere al tiempo transcurrido desde la inscripción hasta la progresión de la enfermedad o la muerte. La PFS generalmente se mide usando el método de Kaplan-Meier y las normas de criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos (RECIST) 1.1. Generalmente, la supervivencia libre de progresión se refiere a la situación en la que un paciente permanece vivo, sin que el cáncer empeore.

El término "RECIST" significa criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos. La pauta, los criterios o las normas RECIST describen un enfoque convencional para la medición y definiciones de tumores sólidos para la evaluación objetiva del cambio en el tamaño del tumor para su uso en ensayos clínicos de cáncer pediátrico y en adultos. RECIST v1.1 significa la versión 1.1 de los criterios RECIST revisados y está publicada en European Journal of Cancers 45 (2009) 228-247.

El término "Repebody" se refiere a una proteína que se deriva de un módulo repetido rico en leucina y que se ha modificado por ingeniería para unirse a una diana específica (véase Lee *et al.*, 2012. PNAS. 109(9): 3299-3304).

El término "responde favorablemente" generalmente se refiere a provocar un estado beneficioso en un sujeto. Con respecto al tratamiento contra el cáncer, el término se refiere a proporcionar un efecto terapéutico al sujeto. Los efectos terapéuticos positivos en el cáncer pueden medirse de diversas maneras (véase, Weber, 2009. J Nucl Med. 50 suplementos 1:1S-10S). Por ejemplo, pueden usarse inhibición del crecimiento tumoral, expresión de marcadores moleculares, expresión de marcadores séricos y técnicas de obtención de imágenes moleculares para evaluar la eficacia terapéutica de un agente terapéutico anticancerígeno. Con respecto a la inhibición del crecimiento tumoral, según los criterios del NCI, un T/C \leq 42 % es el nivel mínimo de actividad antitumoral. Un T/C $<$ 10 % se considera un nivel alto de actividad antitumoral, estando T/C (%) = mediana de volumen tumoral del tratado / mediana de volumen tumoral del control \times 100. Puede evaluarse una respuesta favorable, por ejemplo, por una mayor supervivencia libre de progresión (PFS), supervivencia libre de enfermedad (DFS) o supervivencia global (OS), respuesta completa (CR), respuesta parcial (PR) o, en algunos casos, enfermedad estable (SD), una disminución de la enfermedad progresiva (EP), un tiempo reducido hasta la progresión (TTP) o cualquier combinación de los mismos.

El término "identidad de secuencia" se refiere a un valor en porcentaje obtenido cuando se comparan dos secuencias usando una herramienta de alineación de secuencias por pares. En el presente caso, la identidad de la secuencia se obtiene usando la herramienta de alineación global "EMBOSS Needle" usando la configuración predeterminada (Rice *et al.*, 2000. Trends Genet. 16(6):276-7; Li *et al.*, 2015. Nucleic Acids Res. 43(W1):W580-4). La herramienta de alineación global está disponible en: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/>.

El término "fragmento de unión a antígeno de cadena sencilla" o "scFab" se refiere a una proteína de fusión que comprende un dominio variable y un dominio constante de la cadena ligera de un anticuerpo unido a un dominio variable y un dominio constante de la cadena pesada de un anticuerpo, en la que las cadenas pesada y ligera están unidas entre sí mediante un péptido corto.

El término "fragmento variable de cadena sencilla" o "scFv" se refiere a una proteína de fusión que comprende los dominios variables de cadena pesada (VH) y cadena ligera (VL) de un anticuerpo unidos entre sí con un ligador peptídico. El término también incluye un Fv estabilizado con disulfuro (dsFv). Los métodos para estabilizar scFv con enlaces disulfuro se divulgan en Reiter *et al.*, 1996. Nat Biotechnol. 14(10):1239-45.

"Enfermedad estable" se refiere a la enfermedad sin progresión o recaída tal como se define en los criterios RECIST v1.1. En la enfermedad estable no hay suficiente reducción del tumor para calificar como respuesta parcial, ni suficiente aumento del tumor para calificar como enfermedad progresiva.

El "tiempo hasta la progresión del tumor" (TTP) se define como el tiempo desde la inscripción hasta la progresión de la enfermedad. El TTP generalmente se mide usando los criterios RECIST v1.1.

Los términos "tratamiento" y "terapia", tal como se usan en la presente solicitud, se refieren a un conjunto de medios

higiénicos, farmacológicos, quirúrgicos y/o físicos usados con la intención de curar y/o aliviar una enfermedad y/o síntomas con el objetivo de remediar el problema de salud. Los términos “tratamiento” y “terapia” incluyen métodos preventivos y curativos, ya que ambos están dirigidos al mantenimiento y/o restablecimiento de la salud de un individuo o animal. Independientemente del origen de los síntomas, enfermedad y discapacidad, la administración de un medicamento adecuado para aliviar y/o curar un problema de salud debe interpretarse como una forma de tratamiento o terapia dentro del contexto de esta solicitud.

Descripción

Se han desarrollado con éxito células CART dirigidas contra BCMA con 4-1BB como dominio coestimulador (células ARI2m) que se administrarán en un ensayo clínico multicéntrico de fase I para tratar a pacientes con MM que han recaído o se han vuelto resistentes al tratamiento (R/R) a al menos al menos dos líneas de tratamiento que incluyen inhibidores del proteasoma, agentes inmunomoduladores y un anticuerpo monoclonal anti-CD38. Las presentes células ARI2m se humanizaron para dar ARI2h, lo que demuestra que la actividad de anticuerpo anti-MM se mantuvo en la versión humanizada y, además, se observó un perfil citotóxico más bajo para las células ARI2h.

BCMA apareció como un antígeno prometedor para el tratamiento de MM con células CART en 2013 (Carpenter RO, Evbuomwan MO, Pittaluga S, *et al.* B-cell maturation antigen is a promising target for adoptive T-cell therapy of multiple myeloma. *Clin Cancer Res.* 2013;19(8):2048-2060), lo que condujo en 2016 al primer estudio clínico en pacientes con MM que recibieron células CART BCMA con CD28 como dominio coestimulador (Ali SA, Shi V, Maric I, *et al.* T cells expressing an anti-B-cell maturation antigen chimeric antigen receptor cause remissions of multiple myeloma. *Blood.* 2016;128(13):1688-1700). Aunque estas células CART demostraron eficacia, mostraron un alto perfil citotóxico, ya que todos los pacientes tratados con dosis activas desarrollaron CRS grave. Por tanto, CD28 se reemplazó por 4-1BB, y el nuevo CAR, denominado bb2121, demostró una toxicidad manejable y que se requiere una dosis mínima de 150×10^6 células CART para obtener respuestas (Raje N, Berdeja J, Lin Y, *et al.* Anti-BCMA CAR T-Cell Therapy bb2121 in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med.* 2019;380(18):1726-1737). En paralelo, dos estudios adicionales en pacientes con MM (Cohen AD, Garfall AL, Stadtmauer EA, *et al.* B cell maturation antigen-specific CAR T cells are clinically active in multiple myeloma. *J Clin Invest.* 2019;130; y Zhao WH, Liu J, Wang BY, *et al.* A phase 1, open-label study of LCAR-B38M, a chimeric antigen receptor T cell therapy directed against B cell maturation antigen, in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *J Hematol Oncol.* 2018; 11(1):141), demostraron que un menor número de tratamientos previos conducía a mejores respuestas, y que, aunque la linfocitopenia no es absolutamente necesaria para la expansión y actividad *in vivo* de células CAR-T, la expansión a corto plazo es más constante después de la linfocitopenia. Diferentes factores influyen en la expansión y persistencia de CART que mejorará el control de la enfermedad a largo plazo, un factor que debe mejorarse con la terapia con CARTBCMA, ya que los estudios han demostrado que la mayoría de los pacientes con MM terminan cayendo, un hallazgo que no se observa en los pacientes con LLA tratados con CART19. En este sentido, la persistencia de las células CART podría mejorarse con el uso de CAR humanos o humanizados, ya que los componentes murinos del scFv del CAR inician una reacción inmunitaria por parte del sistema inmunitario humano que conduce a una desaparición temprana de las células CART. Basándose en estos estudios previos, y respaldados por los resultados que muestran que tanto ARI2m como ARI2h evitaron por igual la progresión de la enfermedad, se seleccionaron células ARI2h, que eran células CARTBCMA humanizadas con dominio coestimulador 4-1BB.

Otros factores que afectan a la persistencia de las células CART incluyen el perfil de agotamiento de las células CART y la razón CD4/CD8 en el producto de leucoféresis, que en las células CARTBCMA se correlaciona con la expansión de CART *in vivo*. En la presente invención, independientemente de la razón CD4/CD8 inicial, todas las expansiones *in vitro* lograron una $CD4/CD8 > 1$ que después de la exposición a células tumorales se normalizó a cantidades aproximadamente iguales de CD4 y CD8 debido a la proliferación preferencial de células CD8T. Además, la exposición consecutiva a células tumorales demostró que las células ARI2h lograron una mayor proliferación en comparación con ARI2m, lo que sugiere un menor agotamiento de células ARI2h. En este sentido, estudios en CART19 con dominios coestimuladores CD28 y 4-1BB han demostrado que una fuerte activación de las células CART debido a una alta afinidad o una alta expresión del antígeno diana conduce a un fenotipo de células T efectoras con mayor agotamiento; por el contrario, una activación más débil debido a una menor afinidad conduce a un fenotipo de memoria de células T que reduce el agotamiento. En este caso, el procedimiento de humanización implicó un cambio en la secuencia de aminoácidos que podría haber disminuido la afinidad de CART en las células ARI2h, lo que explica su actividad *in vitro* más lenta en ensayos después de una exposición y, por el contrario, una proliferación de células CART sostenida y mayor después de exposiciones consecutivas a células tumorales, y un control *in vivo* más largo de la enfermedad en un modelo tumoral muy avanzado.

Una alta incidencia de CRS y neurotoxicidad son acontecimientos comunes que se producen después de la administración de células CART, aunque se manejan eficientemente siguiendo las pautas internacionales, el tratamiento con CART ideal debe intentar minimizar el desarrollo de CRS. En este caso, el uso de células ARI2h en lugar de ARI2m se ve respaldado por la observación de un menor perfil tóxico *in vivo* y una menor producción de $TNF\alpha$ *in vitro* de ARI2h en comparación con las células ARI2m. Mientras que la IL6 es la citocina efectora de CRS producida por monocitos y macrófagos que aumenta exponencialmente a medida que se desarrolla el CRS, otras citocinas tales como $TNF\alpha$ e $IL1\beta$ son los principales iniciadores del CRS, ya que los monocitos y macrófagos las

5 producen en momentos tempranos una vez que se activan por $IFN\gamma$ producido por células CART. De hecho, el $TNF\alpha$ actúa como una citocina iniciadora que orquesta la cascada de citocinas en muchas enfermedades inflamatorias y aparece como una diana terapéutica para diferentes enfermedades inflamatorias. En este caso, el presente modelo *in vitro* con macrófagos que imita un modelo más similar al escenario *in vivo* demuestra que las células ARI2h condujeron a una menor producción de $TNF\alpha$ por parte de los macrófagos, un hallazgo relevante, ya que el CRS en pacientes con MM después de CARTBCMA se asoció con un pico más alto de $TNF\alpha$.

10 Por último, en este estudio se analizó cuidadosamente el impacto de sBCMA en la actividad de CART, confirmando que sBCMA distrae las células CART de sus dianas y, además, puede provocar fratricidio entre células CARTBCMA. Aunque los estudios preclínicos y clínicos con CARTBCMA en MM no han encontrado ninguna correlación entre sBCMA y la actividad de CART, se observó que la alta actividad de CART *in vitro* que elimina rápidamente las células de MM impide analizar adecuadamente el papel de sBCMA en estudios preclínicos. Además, la alta dosis de células CARTBCMA requerida en MM en comparación con CART19 en los pacientes con LLA para inducir respuestas condujo al planteamiento de la hipótesis de que sBCMA podría ser responsable de esta alta dosis de CART requerida. Por tanto, los presentes modelos *in vitro* realizados a una baja razón CARTBCMA:MM, con la creación de un entorno con liberación continua de sBCMA y la adición de un inhibidor de γ -secretasa confirmaron el impacto negativo de sBCMA en la actividad de CARTBCMA.

20 En conclusión, en el presente documento se presenta un CART BCMA (en el que el CAR corresponde a ARI2h de SEQ ID NO 13) con 4-1BB como dominio coestimulador que se ha humanizado conservando una alta eficacia y demostrando un perfil tóxico más bajo que su homólogo murino (ARI2m). Este CAR (ARI2h) se expande eficientemente en condiciones de BPF para su uso en un ensayo clínico. Por tanto, un objeto principal de la presente invención es proteger el receptor de antígeno quimérico de ARI2h, así como variantes del mismo tal como se describe en la descripción siguiente.

25 Receptor de antígeno quimérico de ARI2h y variantes del mismo.

30 El objeto de la invención está definido por las reivindicaciones adjuntas. Se proporcionan aspectos adicionales de la divulgación sólo con fines ilustrativos. En un aspecto, la presente divulgación proporciona un receptor de antígeno quimérico (CAR) de ARI2h o variantes del mismo, que comprende un dominio extracelular que comprende un resto que selecciona como diana BCMA, un dominio transmembranario y un dominio de señalización intracelular. Estos dominios se describen detalladamente a continuación.

35 Resto que selecciona como diana BCMA

40 En algunos aspectos, el resto que selecciona como diana BCMA es un anticuerpo, anticalina, Repebody, monocuerpo, scFv, Fab, scFab, Affibody, Fynomer, DARPIn, nanocuerpo o aptámero peptídico que se une específicamente a BCMA.

45 Las moléculas de unión que se unen específicamente a BCMA pueden ser muy útiles en el diagnóstico y tratamiento del MM. En el campo se conocen varios anticuerpos monoclonales murinos contra BCMA. Sin embargo, los anticuerpos murinos están limitados para uso *in vivo* debido a problemas asociados con la administración de anticuerpos murinos a humanos, tal como una semivida sérica corta, la incapacidad de desencadenar determinadas funciones efectoras humanas y la generación de una respuesta inmunitaria no deseada contra el anticuerpo murino. Se han desarrollado nuevos anticuerpos humanos que superan estos inconvenientes mencionados anteriormente.

50 La presentación en fagos y los métodos combinatorios para generar anticuerpos se conocen en la técnica (tal como se describe, por ejemplo, en Ladner *et al.*, patente estadounidense n.º 5.223.409; Kang *et al.*, publicación internacional n.º WO 92/18619; Dower *et al.*, publicación internacional n.º WO 91/17271; Winter *et al.*, publicación internacional WO 92/20791; Markland *et al.*, publicación internacional n.º WO 92/15679; Breitling *et al.*, publicación internacional WO 93/01288; McCafferty *et al.*, publicación internacional n.º WO 92/01047; Garrard *et al.*, publicación internacional n.º WO 92/09690; Ladner *et al.*, publicación internacional n.º WO 90/02809; Fuchs *et al.* (1991) Bio/Technology 9:1370-1372; Hay *et al.* (1992) Hum Antibod Hybridomas 3:81-85; Huse *et al.* (1989) Science 246:1275-1281; Griffiths *et al.* (1993) EMBO J 12:725-734; Hawkins *et al.* (1992) J Mol Biol 226:889-896; Clackson *et al.* (1991) Nature 352:624-628; Gram *et al.* (1992) PNAS 89:3576-3580; Garrard *et al.* (1991) Bio/Technology 9:1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991) Nuc Acid Res 19:4133-4137; y Barbas *et al.* (1991) PNAS 88:7978-7982).

60 Además, en la técnica se conocen métodos para generar y seleccionar armazones que no son de inmunoglobulinas que se unen a una diana particular (véase, por ejemplo, Škrlec, *et al.*, 2015. Trends Biotechnol. 33(7):408-18).

En algunos aspectos, el resto que selecciona como diana BCMA, preferiblemente un anticuerpo, scFv, Fab o scFab, comprende un dominio VH, en el que dicho dominio VH comprende o consiste en SEQ ID NO 1:

*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSRYWMSWVRQAPGKGLEWIGEI
NPDSSTINYAPSLKDRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLYYDY
GDAMDYWGQGTLVTVSS*

o una variante del mismo que tiene al menos el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO 1.

5 En algunos aspectos, el resto que selecciona como diana BCMA, preferiblemente un anticuerpo, scFv, Fab o scFab, comprende el dominio VH mencionado anteriormente y comprende además un dominio VL, en el que dicho dominio VL comprende o consiste en SEQ ID NO 2:

*DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVDSNVAWYQQKPKGKAPKALIFSAS
LRFSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNNYPLTFGGGTKV
EIK*

10 o una variante del mismo que tiene al menos el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO 2.

15 En algunos aspectos, el resto que selecciona como diana BCMA, preferiblemente un anticuerpo, scFv, Fab o scFab, comprende un dominio VL y un dominio VH, en el que dichos dominios VL y VH comprenden o consisten en SEQ ID NO 1 y 2 o una variante de cualquiera de estas secuencias tal como se definió anteriormente. Preferiblemente dicha secuencia VL y dominio VH comprende o consiste en SEQ ID NO 3:

*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSRYWMSWVRQAPGKGLEWIGEI
NPDSSTINYAPSLKDRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLYYDY
GDAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGD
RVTITCKASQSVDSNVAWYQQKPKGKAPKALIFSASLRFSGVPSRFRSGSGSGT
DFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNNYPLTFGGGTKVEIK*

25 o una variante de los mismos que tiene al menos el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO 3.

Se observa en el presente documento que el dominio VL y VH mencionado anteriormente de SEQ ID NO 3 comprende una secuencia ligadora, en particular SEQ ID NO 4: GGGGSGGGGSGGGGS. Sin embargo, podrían usarse otras secuencias ligadoras.

30 Se observa además que el dominio VL y VH, en particular SEQ ID NO 3, podría comprender además una señal peptídica, en el que preferiblemente dicho péptido señal comprende o consiste en SEQ ID NO 5: MEAPAQLLFLLLLWLPDTTG o una variante del mismo que tiene al menos el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO 5.

35 En algunos aspectos, el resto que selecciona como diana BCMA, preferiblemente un anticuerpo, scFv, Fab o scFab, comprende o consiste en SEQ ID NO 6:

*MEAPAQLLFLLLLWLPDTTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSRY
WMSWVRQAPGKGLEWIGEINPDSSTINYAPSLKDRFTISRDNANKNSLYLQMN
SLRAEDTAVYYCASLYYDYGDAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGG
GSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVDSNVAWYQQKPKGKAPKALIFS
ASLRFSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNNYPLTFGGGT
KVEIK.*

40 o una variante del mismo que tiene al menos el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO 6.

Dominio transmembranario

45 El dominio transmembranario puede derivarse de una fuente natural o sintética. Cuando la fuente es natural, el dominio puede derivar de cualquier proteína transmembranaria o unida a membrana. Las regiones

transmembranarias pueden comprender al menos la(s) región/regiones transmembranaria(s) de la cadena α , β o ζ de CD28, CD3, CD45, CD4, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 o CD154. Preferiblemente, las regiones transmembranarias comprenden al menos la(s) región/regiones transmembranaria(s) CD8a.

5 Un dominio transmembranario puede ser sintético o una variante de un dominio transmembranario que se produce de manera natural. En algunos aspectos, los dominios transmembranarios sintéticos o variantes comprenden residuos predominantemente hidrófobos tales como leucina y valina.

10 En algunos aspectos, el dominio transmembranario comprende el dominio transmembranario de CD28, CD3, CD45, CD4, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, o una variante de los mismos, en el que la variante del mismo tiene al menos el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad de secuencia. Preferiblemente, dicho dominio transmembranario comprende o consiste en al menos el dominio transmembranario de CD8a.

15 En algunos aspectos, el dominio transmembranario comprende o consiste en el dominio transmembranario de CD8a o una variante del mismo, en el que la variante del mismo tiene al menos el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad de secuencia.

20 En particular, en algunos aspectos, el dominio transmembranario comprende o consiste en SEQ ID NO: 7 o una variante del mismo que tiene al menos el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO 7.

25 En algunos aspectos, el dominio derivado de CD8a está unido directamente a una región bisagra de CD8, preferiblemente a SEQ ID NO 8:

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI

30 o a una variante de la misma que tiene al menos el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO 8.

Por tanto, en algunos aspectos adicionales el dominio transmembranario comprende además una región bisagra de CD8 y comprende o consiste en SEQ ID NO: 9

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLA

35 **GTCTGVLLLSLVITLYC**

o una variante de la misma que tiene al menos el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO 9.

40 Dominio de señalización intracelular

El dominio de señalización intracelular proporciona la activación de al menos una función de la célula que expresa el CAR tras la unión al ligando expresado en células tumorales. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular contiene uno o más dominios de señalización intracelular. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular es una porción y/o una variante de un dominio de señalización intracelular que proporciona la activación de al menos una función de la célula que comprende CAR.

50 En algunos aspectos, el dominio de señalización intracelular comprende o consiste en el dominio intracelular de CD3 ζ , FcR γ , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD66b, o una variante de los mismos, en el que la variante de los mismos tiene al menos el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad de secuencia.

55 En algunos aspectos, el dominio de señalización intracelular comprende o consiste en el dominio intracelular de CD3 ζ o una variante del mismo, en el que la variante del mismo tiene al menos el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad de secuencia.

60 En algunos aspectos, el dominio de señalización intracelular comprende SEQ ID NO: 10, o una variante del mismo que tiene al menos el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO 10. Cabe señalar que la SEQ ID NO: 10 está representada por la siguiente secuencia:

*RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPPEMGGKP
QRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATK
DTYDALHMQUALPPR*

Dominio de señalización coestimulador

5 Cabe señalar que el CAR de la divulgación, el CAR de ARI2h o variantes del mismo, debe comprender además un dominio de señalización coestimulador. En algunos aspectos, el dominio de señalización coestimulador comprende el dominio intracelular de 4-1BB o una variante del mismo, en el que la variante del mismo tiene al menos el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad de secuencia.

10 En algunos aspectos, el dominio de señalización coestimulador comprende o consiste en el dominio intracelular de 4-1BB o una variante del mismo, en el que la variante del mismo tiene al menos el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad de secuencia.

15 En algunos aspectos, el dominio de señalización coestimulador comprende o consiste en SEQ ID NO: 11 o una variante del mismo que tiene al menos el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO 11. Cabe señalar que el dominio de señalización coestimulador derivado de 4-1BB está representado en el presente documento por SEQ ID NO: 11:

KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL.

20 CAR de secuencia completa según la presente invención

Cabe señalar que la secuencia de aminoácidos completa del CAR de ARI2h según la presente invención comprende o consiste en SEQ ID NO 13:

MEAPAQLLFLLLLWLPD TTGEVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGIDFSRY
WMSWVRQAPGKGLEWIGEINPDSSTINYAPSLKDRFTISRDN AKNSLYLQMN
SLRAEDTAVYYCASLYDYGDAMDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGG
GSDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCKASQSVDSNVAWYQQKPGKAPKALIFS
ASLRFSGVPSRFSGSGSGTDFLT ISSLQPEDFATYYCQQYNNYPLTFGGGT
KVEIKTTTPAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI
WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCR
FPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRR
GRDPEMGGKPKRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD
25 GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

en la que el péptido señal consiste en SEQ ID NO 5;

30 en la que el dominio VH consiste en SEQ ID NO 1;

en la que la secuencia ligadora consiste en SEQ ID NO 4;

en la que el dominio VL consiste en SEQ ID NO 2;

35 en la que la región bisagra de CD8 consiste en SEQ ID NO 8;

en la que el dominio transmembranario consiste en SEQ ID NO 7;

40 en la que el dominio 4-1BB consiste en SEQ ID NO 11; y

en la que el dominio CD3z consiste en SEQ ID NO 10.

En algunos aspectos, un CAR podría caracterizarse por comprender:

45 (i) un resto que selecciona como diana BCMA, preferiblemente un anticuerpo, scFv, Fab o scFab, que comprende o consiste en un dominio VL y un dominio VH, en el que dichos dominios VH y VL comprenden o consisten respectivamente en SEQ ID NO 1 y 2 o cualquier variante de los mismos, en el que la variante de los mismos tiene al menos el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO 1 y/o 2;

50 (ii) un dominio transmembranario unido a un dominio bisagra que comprende o consiste en SEQ ID NO: 9 o una variante del mismo, en el que la variante del mismo tiene al menos el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98

% o el 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO 9;

5 (iii) un dominio de señalización coestimulador que comprende o consiste en SEQ ID NO: 11 o una variante del mismo, en el que la variante del mismo tiene al menos el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de secuencia identidad con SEQ ID NO 11; y

(iv) un dominio de señalización intracelular que comprende o consiste en SEQ ID NO: 10 o una variante del mismo, en el que la variante del mismo tiene al menos el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de secuencia identidad con SEQ ID NO 10.

10 En algunos aspectos, el CAR comprende o consiste en SEQ ID NO: 13

MEAPAQLLFLLLLWLPDTTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSRY
 WMSWVRQAPGKGLEWIGEINPDSSTINYAPSLKDRFTISRDNKNSLYLQMN
 SLRAEDTAVYYCASLYDYGDAMDYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGGSGGG
 GSDIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQSVDSNVAWYQQKPKGKAPKALIFS
 ASLRFSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYNNYPLTFGGGT
 KVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI
 WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCR
 FPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR
 GRDPEMGGKPKRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHD
 15 GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

o una variante del mismo, en el que la variante del mismo tiene al menos el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO 13.

20 Ácido nucleico

En un aspecto, la presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica para uno cualquiera de los CAR de la presente invención. La secuencia de ácido nucleico que codifica para el receptor quimérico liga varios componentes modulares que pueden escindirse y reemplazarse con otros componentes para personalizar el receptor quimérico para una activación de las células T y el reconocimiento de BCMA eficientes.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico es adecuado para transducir o transformar una célula. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es adecuado para transducir o transformar una célula T para su uso en inmunoterapia adoptiva.

30 En algunas realizaciones, el ácido nucleico tiene codones optimizados para su expresión en células de mamífero. Los métodos de optimización de codones son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Parret *et al.*, 2016. *Curr Opin Struct Biol.* 39: 155-162).

35 El ácido nucleico de la presente invención puede estar comprendido en un vector lentiviral que puede usarse para transducir o transformar una célula T (véase Rivière y Sadelain, 2017. *Mol Ther.* 25(5):1117-1124). Actualmente, la transducción de células T con vectores lentivirales es la técnica más ampliamente usada en humanos. El ácido nucleico también puede insertarse en una célula mediante el uso de transposones de ADN, transfección de ARN o técnicas de edición del genoma como TALEN, ZFN y CRISPR/Cas9 (véase Rivière y Sadelain, 2017. *Mol Ther.* 25(5):1117-1124).

Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos completa del CARS según la presente invención comprende o consiste en SEQ ID NO 12:

ATGGAGGCTCCAGCACAGCTCCTTTTTCTGCTCCTCCTGTGGCTCCCTGA
 TACGACCGGAgaagttcaactcgtggagagcgggtgggggactcgtacagccaggtgatctctcag
 45 actttcctgcgctgcatcaggcatagacttttagtcggtactggatgagttgggtacgacaagctcctgggaag

ggcttgaatggattggtgaaatcaacccggacagcagcaccataaattatgctccaagcttgaagaccg
 gttcactatatctcgggataatgctaaaaactccctttaccttcagatgaatagtctccgggcggaagatcgg
 cgggtattactgtgcttctgtactacgactatggcgatgcaatggactattggggccaaggfacgctggga
 ccgtctcatctgggggggaggtagtggaggaggaggttcagggggggcggaagtatattcaaatgac
 acagtctccgtctcactgagtgcttctgtaggggatcgagttacgatcacttgaaggccagccaatccgtgg
 attctaattgttgcgtggtatcagcagaagcccggcaagcgctaaagcactgatatttagcgcatcactccg
 cttttccgggggtcccctccaggttcagtggtagcgggtctggaacagacttcacttcaactatcttcattgcaa
 ccagaagacttcgcgacctattactgtcagcaatacaataactaccgcttacggtcggcgggcgactaaa
 gtcgaaatcaagACGACGACGccggcgccgagaccacctacacctgcaccaactattgctctcag
 ccactgagtgctgcgccccgaggtatgacacctgcccgtggcggggctgtgcacaccaggggctagactt
 cgctgcgatctatatttgggctccactggcaggaacctgtggcgtgctgctgtctctggtcatcacact
 gtactgcaaaagaggcaggaagaaactgctgtatatttcaagcagcccttatgagacctgtgcagacaac
 tcaggaggaagacgggtgcagctgtaggtccctgaggaagaggaaggaggctgtgagctgcgctgaa
 atttctcggagtgcatgccccagcttaccagcagggccagaaccagctgtataacgagctgaatctggg
 gcgagagaggaatacgcgctgctggataagaggcgcgggcgagatccagaaatgggaggaaaacc
 ccagcgacggaagaaccctcaggagggactgtacaatgaactgcagaaggacaaaatgacagaggcc
 tattccgaaatcgggatgaaaggagaaagaaggcgcgcaaggggcatgatggcctgtatcagggactg
 tcaaccgcaacaaaagataacttatgatgctctgcacatgcaggctctgccccgcggtg

Células

- 5 En un aspecto, la presente invención proporciona una célula que comprende el ácido nucleico de la presente invención y/o el CAR de la presente invención. En algunas realizaciones, la célula es una célula T (denominada CART).
- 10 En algunas realizaciones, la célula es una célula T indiferenciada, una célula T madre de memoria o una célula T de memoria central. Actualmente se cree que estas células son más adecuadas para la inmunoterapia adaptativa (véase Rivière y Sadelain, 2017. Mol Ther. 25(5):1117-1124).
- 15 En algunas realizaciones, la célula es una célula T autóloga. El término "célula autóloga" se refiere a una célula obtenida del mismo paciente que va a tratarse usando uno cualquiera de los métodos de la presente invención.
- 20 En algunas realizaciones, la célula es una célula T alotolerante. El término "célula alotolerante" se refiere a una célula que se ha modificado por ingeniería para disminuir el riesgo de una respuesta a la enfermedad de injerto contra huésped. En algunas realizaciones, esto se logra mediante la delección mediada por edición genómica de TCR y/o β 2-microglobulina^{15,19}. Las células alotolerantes se conocen en la técnica (véase la sección de células T alogénicas en Rivière y Sadelain, 2017. Mol Ther. 25(5): 1117-1124).
- 25 En algunas realizaciones, la célula es un precursor linfóide, una célula madre embrionaria o una célula madre pluripotente inducida con la capacidad de diferenciarse en una célula T madura (véase Rivière y Sadelain, 2017. Mol Ther. 25(5): 1117-1124).

Composición farmacéutica

- 30 En un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una pluralidad de células de la presente invención y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 35 Una composición farmacéutica, tal como se describe en el presente documento, también puede contener otras sustancias. Estas sustancias incluyen, pero no se limitan a, crioprotectores, tensioactivos, antioxidantes y agentes estabilizantes. El término "crioprotector", tal como se usa en el presente documento, incluye agentes que proporcionan estabilidad a los CART frente al estrés inducido por la congelación. Los ejemplos no limitativos de crioprotectores incluyen azúcares, tales como sacarosa, glucosa, trehalosa, manitol, manosa y lactosa; polímeros, tales como dextrano, hidroxietilalmidón y polietilenglicol; tensioactivos, tales como polisorbatos (por ejemplo, PS-20

o PS-80); y aminoácidos, tales como glicina, arginina, leucina y serina. Generalmente se usa un crioprotector que presenta baja toxicidad en sistemas biológicos.

En algunas realizaciones, las células se formulan recogiendo en primer lugar de su medio de cultivo y luego lavando y concentrando las células en un medio y sistema de recipiente adecuado para la administración (un portador "farmacéuticamente aceptable") en una cantidad terapéuticamente eficaz. El 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 usarse dextrosa al 5 % en agua o lactato de Ringer. El medio de infusión puede complementarse con albúmina sérica humana, suero bovino fetal u otros componentes del suero humano.

En un aspecto, la presente invención proporciona una célula según la presente invención o una composición farmacéutica según la presente invención para su uso como medicamento.

Métodos de tratamiento

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar el mieloma múltiple que comprende administrar la célula de la presente invención o la composición farmacéutica de la presente invención a un paciente que lo necesita.

En algunas realizaciones, al paciente se le administra una cantidad terapéuticamente eficaz de células. En algunas realizaciones, al paciente se le administra al menos 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 o 10^{10} células. El número de células dependerá del uso final para el que se destina la composición, así como del tipo de células incluidas en la misma.

En algunas realizaciones, la célula o composición farmacéutica se administra por vía intravenosa, intraperitoneal, en la médula ósea, en el ganglio linfático y/o en el líquido cefalorraquídeo.

En algunas realizaciones, el método comprende una terapia combinada. En algunas realizaciones, el método comprende además administrar un inhibidor de puntos de control inmunitario (véase Lim & June, 2017. Cell. 168(4):724-740). En una realización adicional, el método comprende además administrar un inhibidor de puntos de control inmunitario y/o un inhibidor de IAP (véase el documento WO 2016/054555).

En algunas realizaciones, la célula o composición farmacéutica, tal como se describe en el presente documento, se administra en combinación con agentes quimioterapéuticos y/o inmunosupresores. En una realización, en primer lugar, se trata a un paciente con un agente quimioterapéutico que inhibe o destruye otras células inmunitarias, seguido de la célula o composición farmacéutica descrita en el presente documento. En algunos casos, la quimioterapia puede evitarse por completo.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la presente invención, pero no limitan la misma.

Ejemplos

Material y métodos

Declaración de ética: la investigación con materiales humanos fue aprobada por el Comité Ético de Investigación Clínica (Hospital Clínic, Barcelona). Las células T de sangre periférica (PB) se obtuvieron de donantes sanos que dieron su consentimiento informado. Todo el trabajo con animales se realizó bajo el Comité Ético de Investigación con Animales (Hospital Clínic, Barcelona).

Cultivos celulares: RPMI8226, U266 y K562 se adquirieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA). La línea celular ARP1 fue proporcionada amablemente por el Centro de Investigación de Mieloma Múltiple (Little Rock, AK, EE.UU.). Las líneas celulares (K562, RPMI8226 y ARP1) se cultivaron en RPMI con suero bovino fetal (FBS) al 10 % y penicilina/estreptomicina al 1 % (pen/estrep) y U266 con FBS al 15 %. Se cultivaron células 293-T con DMEM con FBS al 10 % y pen/estrep al 1 %. Los linfocitos se obtuvieron de donantes sanos mediante Ficoll y agotamiento magnético con kit de aislamiento de células T (Miltenyi Biotec). Las células T se expandieron en medio Click (50 % de RPMI, 50 % de medio Click de Irvine Scientific) y complementado con suero humano al 5 % y pen/estrep al 1 %) y se activaron con reactivos Dynabeads CD3/CD28 activadores de linfocitos T humanos (Thermo Fisher Scientific) y IL-2 (100 UI) en días alternos. Los experimentos se realizaron después de 8 - 10 días de expansión de células T. Los macrófagos se diferenciaron de los monocitos después de la expansión con RPMI con FBS al 10 % y M-CSF 0,1 mg/ml (Thermo Fisher Scientific) durante 1 semana.

Clonación y humanización: el dominio transmembranario de ARI2m, el dominio coestimulador (4-1BB) y CD3 ζ se obtuvieron a partir de un vector lentiviral que contenía el CART19 usado en la presente Institución (pCCL-EF1 α -CD19-CD8a-41 BB-CD3 ζ). El scFv-CD19 se sustituyó por el scFv BCMA que se obtuvo del anticuerpo anti-BCMA J22.9, publicado previamente por Oden F. *et al.* y que estaba disponible de forma gratuita en NCBI-Protein Genbank.

ES 2 971 033 T3

La secuencia de aminoácidos completa correspondiente al péptido señal, VH, ligador, VL, región bisagra de CD8, CD8 TM, 4-1BB y CD3 ζ correspondientes al ARI2m murina se muestra a continuación:

MURINA (ARI2m) (SEQ ID NO 14):

5 MEAPAQLLFLLLLLWLPDTTGQVQLQQSGGGLVQPGGSLKLSCAASGIDFSRYWMSWVRRAPG
KGLEWIGEINPDSSTINYAPSLKDKFIIISRDNANTLYLQMSKVRSEDTALYYCASLYYDYG
DAMDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIVMTQSQRFMTTSVGDRVSVTCKASQSVDS
NVAWYQQKPRQSPKALIFASALRFSGVPARFTGSGSGTDFTLTI SNLQSEDLAEYFCQQYNN
YPLTFGAGTKLELKTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI
WAPLAGTCGVLLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCE

LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKQRRKNPQEGLYN
ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

10 Péptido señal (SEQ ID NO 5):

MEAPAQLLFLLLLLWLPDTTG

VH (SEQ ID NO 15):

15 QVQLQQSGGGLVQPGGSLKLSCAASGIDFSRYWMSWVRRAPGKGLEWIGEINPDSSTINYAPSLKDKF
IIISRDNANTLYLQMSKVRSEDTALYYCASLYYDYGAMDYWGQGTSTVTVSS

Ligador (SEQ ID NO 4):

20 GGGGGGGGGGGGGS

VL (SEQ ID NO 16):

DIVMTQSQRFMTTSVGDRVSVTCKASQSVDSNVAWYQQKPRQSPKALIFASALRFSGVPARFTGSGSG
TDFTLTI SNLQSEDLAEYFCQQYNNYPLTFGAGTKLELK

25 Región bisagra de CD8 (SEQ ID NO 8):

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI

30 CD8 TM (SEQ ID NO 7):

YIWAPLAGTCGVLLLLSLVITLYC

4-1BB (SEQ ID NO 11):

35 KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL

CD3 ζ (SEQ ID NO 10):

40 RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKQRRKNPQEGLYNE
LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

Para obtener ARI2h, se humanizó el scFv de la secuencia de ARI2m usando dos modelos predictivos (Blast y línea germinal) para sustituir aminoácidos murinos por sus homólogos en humanos, excluyendo tanto la región determinante de complementariedad (CDR) como la zona de Vernier. Una vez que la secuencia estuvo lista, se clonó en el vector pCCL usando el mismo procedimiento que para ARI2m. La secuencia humanizada, así como las diferencias en la secuencia de aminoácidos entre ARI2h y ARI2m se muestran a continuación:

HUMANIZADA (ARI2h (la variante de la línea germinal) que corresponde a SEQ ID NO 13):

ES 2 971 033 T3

MEAPAQLLFLLLLWLPDTTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSRYWMSWVRQAPG
KGLEWIGEINPDSSTINYAPSLKDRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLYYDYG
DAMDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVDS
NVAWYQQKPKGKAPKALIFASLRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNN
YPLTFGGGKVEIKTTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI
WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE
LRVKFSRSADAPAYQQGQNLQYNEINLGRREEYDVLDKRRGRDPENGGKPKRRKNPQEGLYN
ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

VH (SEQ ID NO 1):

5 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSRYWMSWVRQAPGKGLEWIGEINPDSSTINYAPSLKDRF
TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLYYDYGAMDYWGQGT LVTVSS

Ligador (SEQ ID NO 4):

10 GGGGGGGGGGGGS

VL (SEQ ID NO 2):

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVDSNVAWYQQKPKGKAPKALIFASLRFSGVPSRFSGSGSG
TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNNYPLTFGGGKVEIK

15 Región bisagra de CD8 (SEQ ID NO 8):

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI

20 CD8 TM (SEQ ID NO 7):

YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC

4-1BB (SEQ ID NO 11):

25 KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

CD3ζ (SEQ ID NO 10):

RVKFSRSADAPAYQQGQNLQYNEINLGRREEYDVLDKRRGRDPENGGKPKRRKNPQEGLYNE
LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

30 Diferencias de aminoácidos realizadas durante el procedimiento de humanización (comparación entre ARI2m y ARI2h):

35 **negrita:** CDR

cursiva: zona de Vernier

subrayado: AA cambiado

40 VH:

Murino (AR2m):

45 **Q**QLQQSGGGLVQPGGSLKLSCAAS**G**IDFSRYWMSWVRQAPGKLE**W**IG**E**INPDSSTINYAP
SLKDRFTISRDNAKNTLYLQMSKVRSEDTALYYC**ASLYYDYGAMDY**WGQGT**S**VTVSS

Humanizado (AR2h):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSRYWMSWVRQAPGKLEWIGEINPDSSTINYAP
SLKDRFTISRDNAKNSLYLQMN**SLRAEDTAVYYCASLYYDYGAMDY**WGQGT**L**VTVSS

50 VL:

Murino (AR2m):

DIVMTQSQRFMTTSVGDVRVSVTC**KASQSVDSNVA**WQQKPRQSPK**ALITFSASLRFS**GVVPARF
 TGS**SGTD**FTLTIISNLQSEDLAEYFC**QYNNYPLT**FGAGTKLELK

Humanizado (AR2h):

5

D**IVMTQSPSSLSAS**VGDRV**ITTC****KASQSVDSNVA**WQQK**PKAPKALITFSASLRFS**GVVPSRF
 S**SGSGTD**FTLTIIS**SLOPED**EAT**Y**Y**COYNNYPLT**FG**GG**GTK**VEIK**

Producción de virus y expresión de CAR: se transfectaron células 293-T con vectores lentivirales (pCCL-EF1 α -BCMA, pREV-REV, pMDLg/pRRE y pCMV-VSV-G) para producir virus lentivirales y después de 48 horas se recogió el sobrenadante y se concentró con el concentrador LentiX (Clontech, Takara) siguiendo el protocolo del fabricante. Los lentivirus concentrados se mantuvieron a -80 °C hasta su uso. Las células T de donantes sanos se activaron el día 0 con Dynabeads y se transdujeron con lentivirus concentrado el día 2 añadiendo Polybrene (Merck Millipore) y se centrifugaron a 2000 rpm durante 1 hora.

Citometría de flujo: para la detección de CAR-BCMA, las células se incubaron con una proteína BCMA-Fc recombinante (Enzo Life Sciences) y luego con un anticuerpo secundario anti-IgG humana específico para FC conjugado con Brilliant Violet (BV)-421 (Biolegend). Los anticuerpos usados para la tinción de células T y el agotamiento fueron CD3-APC y CD8-PE (Becton Dickinson), PD1-APC, TIM3-APC y LAG3-APC (Thermo Fisher Scientific). Se tiñeron células de mieloma múltiple con CD138-BV421 (Becton Dickinson) y BCMA-APC (Biolegend). El análisis de citometría de flujo para todos los experimentos se realizó usando el software FlowJo.

Ensayos de proliferación: las células CAR-T se tiñeron con el kit de proliferación celular CFSE CellTrace™ (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) antes de cultivarlas conjuntamente en diferentes condiciones y líneas celulares durante 96 horas. La proliferación se analizó mediante citometría de flujo.

Producción de citocinas y sBCMA: las citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-1 β se cuantificaron mediante ELISA (ELISA MAXTM Deluxe Set, Biolegend) siguiendo el protocolo del fabricante. El BCMA soluble se detectó mediante ELISA (Human BCMA/TNFRSF17 DuoSet ELISA, R&D systems) siguiendo el protocolo del fabricante.

Microscopía confocal: la línea celular RPMI se transdujo con partículas lentivirales para sobreexpresar BCMA fusionado con proteína fluorescente verde (GFP) y luego se cultivó conjunto con células CART teñidas con colorante CMAC CellTracker™ Blue (Thermo Fisher Scientific). Además, BCMA también se detectó mediante microscopía de fluorescencia confocal con anticuerpo monoclonal de ratón anti-TNRSF17 (Sigma-Aldrich) y anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con Alexa 647 (Cell signaling Technologies). Las imágenes se adquirieron usando un microscopio Leica SP5. Se usaron láseres 405, 488 y 633 para la excitación, realizando imágenes de adquisición de pila Z y aplicando los filtros correspondientes. Las adquisiciones de imágenes *in vivo* con lapso de tiempo se realizaron cada 20 segundos.

Citotoxicidad: los ensayos se realizaron en diferentes razones efector:diana de desde 1:1 hasta 0,125:1 desde 24 hasta 96 h de cultivo conjunto de células T y células tumorales modificadas con un vector lentiviral (pLV) para sobreexpresar GFP-luciferasa de luciérnaga (GFP-ffLuc). El porcentaje de células tumorales positivas para GFP que permanecían vivas se estudió mediante citometría de flujo aplicando la fórmula: % de células vivas = % de células positivas para GFP en el tiempo \times % de células positivas para GFP a las 0 h).

Modelo murino de mieloma *in vivo*: se irradiaron ratones NOD/SCID IL-2Rnull (NSG) de 8-12 semanas de edad a 2G el día -1 y en el día 0 se inocularon células GFP-ffLuc-ARP-1. Los ratones recibieron o bien 1 o bien 1,5x10⁶ de células ARP1/ratones dependiendo de si eran ratones hembra o macho, respectivamente. Se permitió que las células tumorales proliferaran durante 6 a 14 días y luego se inocularon células T NT o células CART en ratones. Se sometieron los ratones fueron a la obtención de imágenes de bioluminiscencia (BLI) semanales. BLI se realizó usando una cámara CDD en color Hamamatsu (Hamamatsu Photonics Systems, Bridgewater, NJ) después de una inyección i.p. de 100 μ l de D-luciferina (20 mg/ml de PBS). La cuantificación de la señal se realizó con el software ImageJ.

Resultados

55

Diseño y caracterización funcional de una CARTBCMA murina (ARI2m)

El diseño de ARI2m se basó en el CART19 (ARI1) que contiene CD8a, 4-1BB y CD3 ζ como región bisagra, dominio transmembranario, dominio coestimulador y dominio de señalización, respectivamente. El fragmento variable de cadena sencilla (scFv) que codifica para anticuerpo anti-CD19 (anticuerpo A3B1) se intercambió por la secuencia del anticuerpo anti-BCMA J22.9 21, que se había probado con éxito contra MM 22. Esta secuencia completa se clonó en un vector lentiviral pCCL de tercera generación (figura 1A). Las eficiencias de transfección de células CART fueron superiores al 30 % y variaron entre el 30 y el 60 % en todos los experimentos *in vitro* e *in vivo* de la presente

60

invención, que se conservaron después de la crioconservación y descongelación de las células CART (figura 1B). La eficacia de ARI2 contra diferentes líneas celulares de MM (ARP1 y U266) se confirmó después de cultivar conjuntamente células T y células de MM en una razón E:T de 1:1 durante cuatro días, lo que demostró una eliminación eficiente de las células de MM en comparación con células T no transducidas (figura 1C). Además, las células K562 distintas de MM, que no expresan BCMA, no fueron eliminadas por las células ARI2m, lo que demuestra la especificidad de las células ARI2m (figura 1C). Además, limitar los ensayos de citotoxicidad por dilución de razones E:T de desde 1:1 hasta 0,125:1 demostró la alta eficacia de las células ARI2m al eliminar las células de MM a las 36 h (figura 1D) a una razón E:T baja que continuó aumentando a las 72 h (figura 1E). Tal como se esperaba, no se detectó toxicidad contra las células K562 (figuras 1D y 1E).

La producción de citocinas proinflamatorias por células ARI2m también se analizó a las 24 y 48 h de cultivo conjunto de células ARI2 y células de MM en diferentes razones E:T. Se observó una alta producción de $IFN\gamma$ por parte de las células ARI2m a las 24 h, que continuó aumentando a las 48 h (figura 1F). Se detectó cierta producción de $IFN\gamma$ en las células T no transducidas (NT), tal como se esperaba, ya que las células T NT se activan debido a la expansión *in vitro*. También se detectaron niveles mínimos de IL6 a las 24 h y aumentaron a las 48 h de cultivo conjunto. Además, tal como se esperaba, se observó cierta secreción de IL6 para células de MM solo (figura 1F). La producción de $TNF\alpha$ disminuyó a las 48 h en comparación con las 24 h, lo que demuestra que el $TNF\alpha$ se produce en los primeros momentos de la activación de CART (figura 1F). Desafortunadamente, la producción de $IL1\beta$ no pudo detectarse en este sistema *in vitro*.

Se analizó la eficacia *in vivo* de células ARI2m en el presente modelo murino donde los ratones NSG recibieron 1×10^6 de células ARP1 de MM, y se trataron 6 días después con 10×10^6 de células NT o con 10×10^6 de células T que contenían 2×10^6 de células ARI2m (figura 1G). La progresión de la enfermedad que se siguió mediante bioluminiscencia mostró que las células ARI2m evitaron la progresión de la enfermedad en comparación con los ratones no tratados y los ratones tratados con células T NT (figura 1H), lo que se tradujo en una mayor supervivencia (figura 1I). Además, el análisis de los tejidos de los ratones al final del experimento mostró ausencia de células de MM en la MO y el bazo (figura 1J); y que mientras que las células T se encontraron principalmente en el bazo (figura 1K), las células CART proliferaron principalmente en la MO, como lo indica un mayor porcentaje de células CART de toda la población de células T en la MO que en el bazo (figura 1K), un hallazgo de gran relevancia ya que el MM es una enfermedad de la MO. Además, como marcador adicional para la progresión del MM, se analizó la cantidad de sBCMA en el suero de ratones, confirmando una gran cantidad de sBCMA en ratones tratados con células T NT y la ausencia total de sBCMA en ratones tratados con células ARI2m (figura 1L).

Humanización de ARI2m para dar ARI2h y comparación de ARI2m frente a ARI2h

La desaparición temprana de las células CART en pacientes, que puede conducir a respuestas no duraderas, está asociada a un xenorreconocimiento por parte del sistema inmunitario humano contra el componente murino del scFV en el CAR. Por tanto, se realizó la humanización de scFv de ARI2m. Se crearon dos variantes diferentes de ARI2 (Blast y línea germinal) basadas en dos algoritmos predictivos diferentes mediante la sustitución de aminoácidos (aa) murinos por aa que se encuentran con mayor frecuencia en el código humano. Mientras que, para la cadena pesada, ambas variantes mostraron el mismo número de aa sustituidos en comparación con la secuencia murina, para la cadena ligera, la variante de línea germinal tuvo un menor número de aa sustituidos que la variante Blast (figura 2A). La comparación *in vitro* de la eficacia de ambas variantes demostró una actividad anti-MM ligeramente mayor para la variante de la línea germinal (figura 2B) y especificidad contra las células de MM para ambas variantes, ya que ninguna de ellas eliminó las células K562 (figura 2B). Por tanto, se seleccionó la variante de la línea germinal para todos los ensayos adicionales para comparar ARI2m frente a ARI2h (para ver las secuencias completas de ambos CAR, remítase a los materiales y métodos). Como se observó una eficacia *in vitro* ligeramente inferior de ARI2h frente a ARI2m (figura 2B), se realizó un ensayo de citotoxicidad a largo plazo cultivando conjuntamente células tumorales y CART en una razón E:T baja (0,125:1). Este ensayo demostró que, aunque ARI2h es más lento que ARI2m, logra su objetivo al eliminar todas las células de MM (figura 2C). Además, un ensayo de proliferación confirmó una tasa de proliferación más lenta para las células ARI2h. Además, mientras que se observó la misma producción *in vitro* de $IFN\gamma$ para ambos CAR en un ensayo de citotoxicidad a largo plazo (figura 2C), se demostró una menor producción de $TNF\alpha$ e IL6 para ARI2h frente a ARI2m, lo que sugiere un perfil tóxico más bajo para ARI2h.

Se compararon ARI2h y ARI2m *in vivo* en dos modelos diferentes de enfermedad MM (temprano y avanzado). Los ratones recibieron células de MM el día 0 y se trataron con 5×10^6 de células CART o bien el día 6 o bien el día 14 para crear un modelo temprano y avanzado de la enfermedad, respectivamente (figuras 2D y 2E). En el modelo de enfermedad temprano, tanto ARI2h como ARI2m evitaron la progresión de la enfermedad MM por igual (figuras 2D y 2F). Tal como se esperaba, alrededor del día 50 los ratones comenzaron a mostrar signos de enfermedad de xenoinjerto contra huésped (EICH), que fue más grave en el grupo de ARI2m y se tradujo en una menor supervivencia para este grupo (figura 2G). En el modelo de enfermedad avanzado, mientras que ARI2m no permitió ninguna progresión de la enfermedad, se detectó alguna señal de enfermedad en el grupo ARI2h en determinados momentos (figura 2E), pero no fue significativa (figura 2F). Además, los ratones tratados con ARI2h sobrevivieron más tiempo debido a una toxicidad mucho menor en comparación con ARI2m (figura 2G). El análisis de tejidos de

ratones mostró nuevamente una mayor localización de células T en el bazo en comparación con la MO (figura 2H). En ambos modelos, la proliferación de células T fue mayor para ARI2m que para ARI2h, lo que podría explicar la mayor toxicidad de ARI2m (figura 2H); y, lo que es más importante, para ambos CAR y en ambos modelos de enfermedad, la mayoría de las células T en la MO eran células CART (figura 2H). Por último, el análisis del suero de ratones mostró que ambos CAR secretaban altas cantidades de IFN γ . Sin embargo, y según observaciones previas de un perfil tóxico más bajo para ARI2h, la producción de IFN γ por ARI2h fue más lenta que para ARI2m. Por tanto, en el modelo temprano, mientras que 3 días después de la infusión de CART la producción de IFN γ no pudo detectarse en el grupo ARI2h, 31 días después de la infusión de CART tanto ARI2m como ARI2h mostraron una alta cantidad de producción de IFN γ (figura 2I). En el modelo avanzado se observó el mismo patrón, mostrando a los 5 días de administración de CART ausencia de producción de IFN γ con ARI2h, y a los 21 días una producción alta de IFN γ para ambos CAR, aunque menor para ARI2h (figura 2I).

Estos resultados sugirieron una actividad más rápida de ARI2m frente a ARI2h, lo que hace posible que, en casos de una alta carga tumoral, esto conduzca a un agotamiento más rápido de las células CART. Por tanto, se realizó un tercer experimento *in vivo* con una dosis más baja de células CART (3×10^6). En este caso, la bioluminiscencia de la obtención de imágenes mostró que la enfermedad estaba más avanzada cuando los ratones recibieron células CART el día 14 en comparación con el modelo avanzado anterior. En este modelo, ni ARI2m ni ARI2h pudieron evitar la progresión de la enfermedad. Sin embargo, ARI2h tuvo un mejor rendimiento que ARI2m, mostrando una menor progresión de la enfermedad y sugiriendo que su actividad más lenta podría conducir a un menor agotamiento de las células CART en casos de alta carga tumoral.

Respuesta a exposiciones consecutivas a células tumorales y respuesta inflamatoria de ARI2m frente a ARI2h

Resultados anteriores mostraron que ARI2h tenía una actividad *in vivo* más lenta, lo que se traducía en una menor toxicidad en cuanto a xeno-EICH. Además, una alta carga tumoral disminuyó la eficacia de ARI2m, lo que, según la hipótesis, podría deberse a un agotamiento más rápido de ARI2m frente a ARI2h. Para confirmar esta hipótesis, se expusieron células CART a exposiciones *in vitro* consecutivas con células tumorales (figura 3A). Estos experimentos mostraron, en primer lugar, que la expansión *in vitro* de células T logró un mayor número de células T CD4 en comparación con las células T CD8, un hallazgo observado tanto para las células CART como para las T NT. Sin embargo, la exposición a células tumorales condujo a una mayor proliferación de células T CD8, lo que llevó a una normalización de esta razón CD4/CD8 (figura 3B).

Además, las exposiciones consecutivas de células CART a células tumorales demostraron una mayor proliferación de células CD4 y CD8-CART para ARI2h, mientras que para ARI2m, esta proliferación no fue continua (figura 3C), lo que sugiere que después de exposiciones consecutivas a células de MM, las células ARI2m se volvieron o bien agotadas o bien moribundas.

Además, se comparó el perfil proinflamatorio de ambos CAR estableciendo un modelo más similar al síndrome de liberación de citocinas (CRS) observado en pacientes, donde los macrófagos, después activarse por células CART, son los principales productores de IL6, IL1 β y TNF α . Por tanto, los monocitos y las células T aislados de los mismos individuos se diferenciaron en macrófagos y células CART, respectivamente, y ambos se añadieron a cultivos conjuntos *in vitro* con células de MM para evaluar la citotoxicidad y la producción de citocinas (figura 3E). La adición de macrófagos no afectó negativamente a la actividad anti-MM de CART (figura 3F), aumentó ligeramente la producción de IFN γ (figura 3G) y se indujo un gran aumento en la producción de IL6 y TNF α (figura 3G). Además, la IL1 β , que no pudo detectarse en ausencia de macrófagos, se detectó en grandes cantidades después de la adición de macrófagos (figura 3G). Por tanto, en este entorno, se comparó la actividad proinflamatoria de ARI2m y ARI2h durante dos días, demostrando una producción similar IFN γ , IL6 e IL1 β para ambos CAR (figura 3G) y una menor producción de TNF α para ARI2h (figura 3H), lo que sugiere una menor actividad proinflamatoria y tóxica para ARI2h, tal como se indicó previamente en los estudios *in vivo* (figuras 2D-2G).

Producción clínica eficiente y actividad de ARI2m y ARI2h

Estos datos previos respaldaron el desarrollo de un ensayo clínico multicéntrico de fase I para pacientes con MM (código EudraCT: 2019-001472-11) que comenzó en 2019 con células ARI2 producidas en la presente Institución y proporcionadas a todos los centros participantes. Por tanto, ARI2m y ARI2h se expandieron en las instalaciones de BPF de la presente Institución siguiendo el mismo protocolo que está usándose en la presente Institución para el ensayo clínico multicéntrico de fase II en neoplasias malignas de células B con células ARI1 17. Tanto ARI2m (figuras 4A y 4C) como ARI2h (figuras 4B y 4C) se expandieron eficientemente logrando un mayor número de células CART que el mínimo requerido ($>150 \times 10^9$ células CART) para lograr respuestas en pacientes con MM. La comparación de 4 expansiones clínicas mostró que al final de la expansión se logró un número comparable de células ARI2h y ARI2m, aunque se obtuvo un mayor porcentaje de células ARI2h esta diferencia no fue significativa y probablemente se debió a una mayor titulación del virus para ARI2h (figura 4C). Además, estas células CART mostraron una alta eficacia eliminando células de MM a razones E:T bajas (figura 4D).

BCMA soluble afecta a la actividad de ARI2

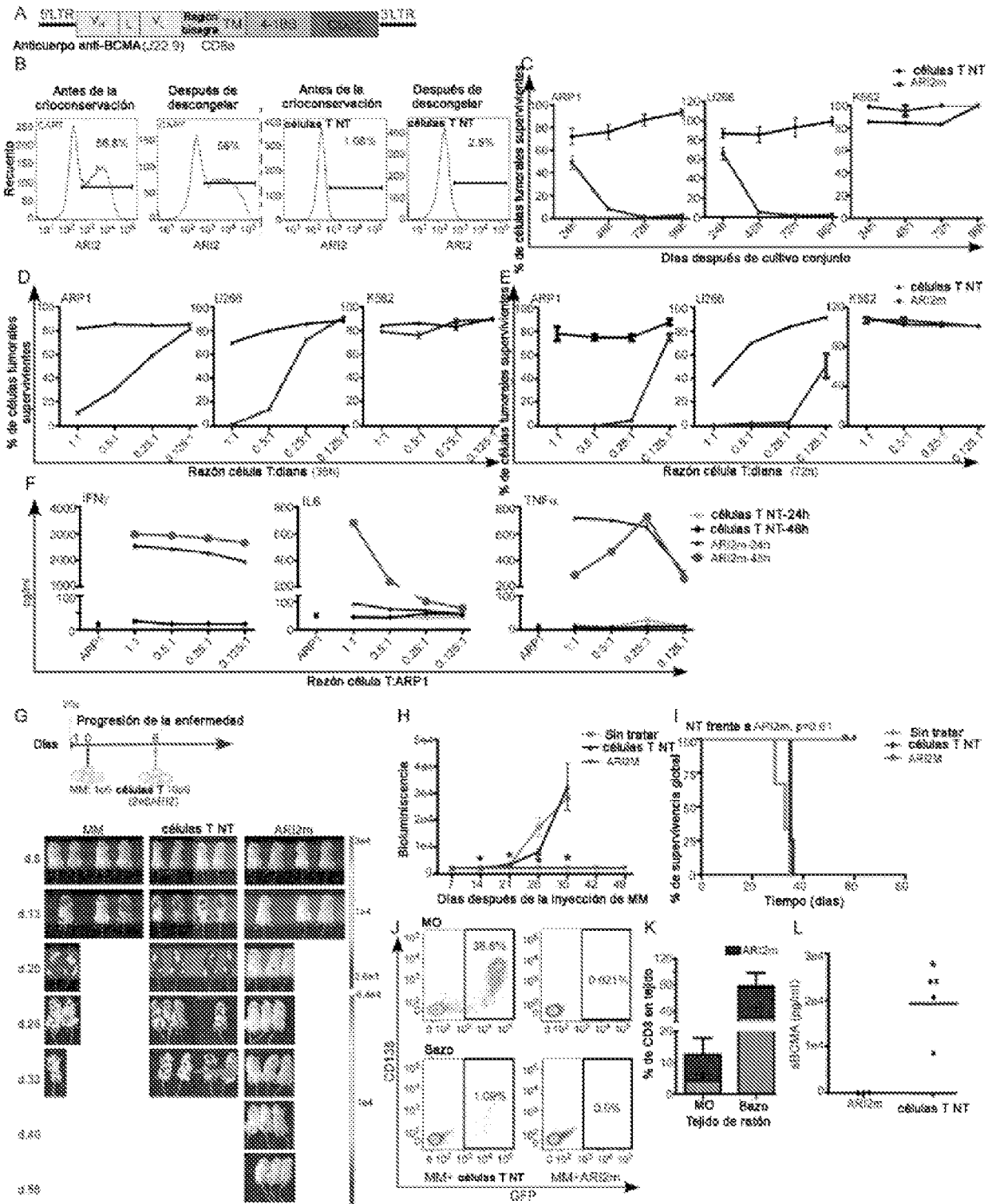
Los estudios clínicos con CART19 en LLA han demostrado que una dosis más baja de células CART (100×10^6) se requiere para lograr respuestas completas (CR) en comparación con estudios en MM con CARTBCMA ($>150 \times 10^6$). En este sentido, la expresión de BCMA en la superficie de las células de MM no es estable, ya que se libera continuamente como sBCMA al medio extracelular. Por tanto, se planteó la hipótesis de que sBCMA podría unirse a las células CARTBCMA inhibiendo temporalmente su actividad y explicando la alta dosis requerida en pacientes con MM para lograr la CR. Por tanto, en primer lugar, se midió en pacientes con gammapatía monoclonal de significado indeterminado (MGUS), en pacientes con MM recién diagnosticados y en recaída, la cantidad de sBCMA en suero, confirmando una mayor cantidad de sBCMA en pacientes con MM (figura 5A). Además, la microscopía de fluorescencia confocal confirmó que las células de MM liberan BCMA en vesículas (figura 5B). Por tanto, para confirmar que sBCMA podría afectar temporalmente a la actividad de CARTBCMA, se cultivaron conjuntamente células de MM que sobreexpresaban BCMA fusionado con GFP (MM-BCMA-GFP) con células ARI2 durante 3 horas realizando obtención de imágenes de lapso de tiempo *in vivo*. Se confirmó que el sBCMA liberado en las vesículas se une a las células ARI2 distrayendo las células ARI2 de sus células de MM diana (figura 5C). Además, también se observó que las células ARI2 después de entrar en contacto con células de MM podían adquirir en sus membranas parte del BCMA de la superficie de las células de MM y, como consecuencia, se observó fratricidio entre células ARI2 (figura 5D).

Para confirmar adicionalmente que sBCMA inhibe la actividad de CART, se cultivaron conjuntamente células de MM con células ARI2m en presencia de proteína BCMA recombinante con y sin un anticuerpo anti-BCMA. Los resultados confirmaron que la proteína BCMA recombinante inhibe la actividad de ARI2m en cuanto a citotoxicidad y producción de $IFN\gamma$ (figuras 5E y 5F). La adición de un anticuerpo anti-BCMA restableció parcialmente esta inhibición únicamente en cuanto a producción de $IFN\gamma$ y no citotoxicidad (figuras 5E y 5F). Además, el sBCMA liberado de las células de MM conduce a una disminución de la expresión de BCMA en las células de MM, un efecto mediado por la γ -secretasa, que escinde directamente el BCMA liberando BCMA soluble, y que puede evitarse con el uso de inhibidores de la γ -secretasa. Por tanto, en primer lugar, se analizó el impacto de un inhibidor de la γ -secretasa (DAPT) en la expresión de BCMA en las células de MM y en la cantidad de sBCMA liberado. Tal como se esperaba, el tratamiento con DAPT aumentó la expresión de BCMA en células de MM y disminuyó la liberación de sBCMA (figuras 5G y 5H). Este aumento de la expresión de BCMA asociado a DAPT también se detectó después del cultivo conjunto de células de MM con células T NT (figura 5G). La adición de DAPT a los cultivos conjuntos de células ARI2/MM también disminuyó la cantidad de sBCMA. Sin embargo, el impacto en la expresión de BCMA apenas se detectó en cultivos conjuntos *in vitro* normales debido a la alta actividad *in vitro* de ARI2 que elimina las células de MM (figuras 5G y 5H). Para confirmar un posible papel de DAPT que mejora la actividad de ARI2 al disminuir la cantidad de sBCMA, se analizó su impacto en un entorno *in vitro* con una liberación continua de sBCMA por células de MM no afectadas por células ARI2. Por tanto, se realizaron los mismos experimentos *in vitro* en paralelo en placas Transwell, donde las células de MM no afectadas por las células ARI2 podían liberar continuamente sBCMA (figura 5I). En este entorno, se confirmó que la liberación continua de sBCMA por las células de MM no afectadas disminuyó la actividad de ARI2 (figura 5J), y que la adición de DAPT evitó parcialmente el impacto negativo del sBCMA liberado por las células de MM no afectadas (figura 5J).

REIVINDICACIONES

1. Receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende:
 - 5 a. un resto que selecciona como diana BCMA de fragmento variable de cadena sencilla "scFV", que comprende un dominio VL y un dominio VH, en el que dichos dominios VH y VL comprenden respectivamente las SEQ ID NO 1 y 2;
 - 10 b. un dominio transmembranario unido a un dominio bisagra que comprende SEQ ID NO: 9;
 - c. un dominio de señalización coestimulador que comprende SEQ ID NO: 11; y
 - d. un dominio de señalización intracelular que comprende SEQ ID NO: 10.
- 15 2. Receptor de antígeno quimérico (CAR) según la reivindicación 1, en el que el CAR consiste en SEQ ID NO: 13.
3. Ácido nucleico que codifica para el CAR según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.
- 20 4. Célula que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 3.
5. Célula según la reivindicación 4, en la que la célula es una célula T.
- 25 6. Composición farmacéutica que comprende una pluralidad de células según la reivindicación 5 y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.
7. Célula según la reivindicación 5 o composición farmacéutica según la reivindicación 6, para su uso como medicamento.
- 30 8. Célula según la reivindicación 5 o composición farmacéutica según la reivindicación 6, para su uso en un método de tratamiento de mieloma múltiple, en la que el método comprende administrar la célula o composición a un paciente que lo necesita.

Figura 1



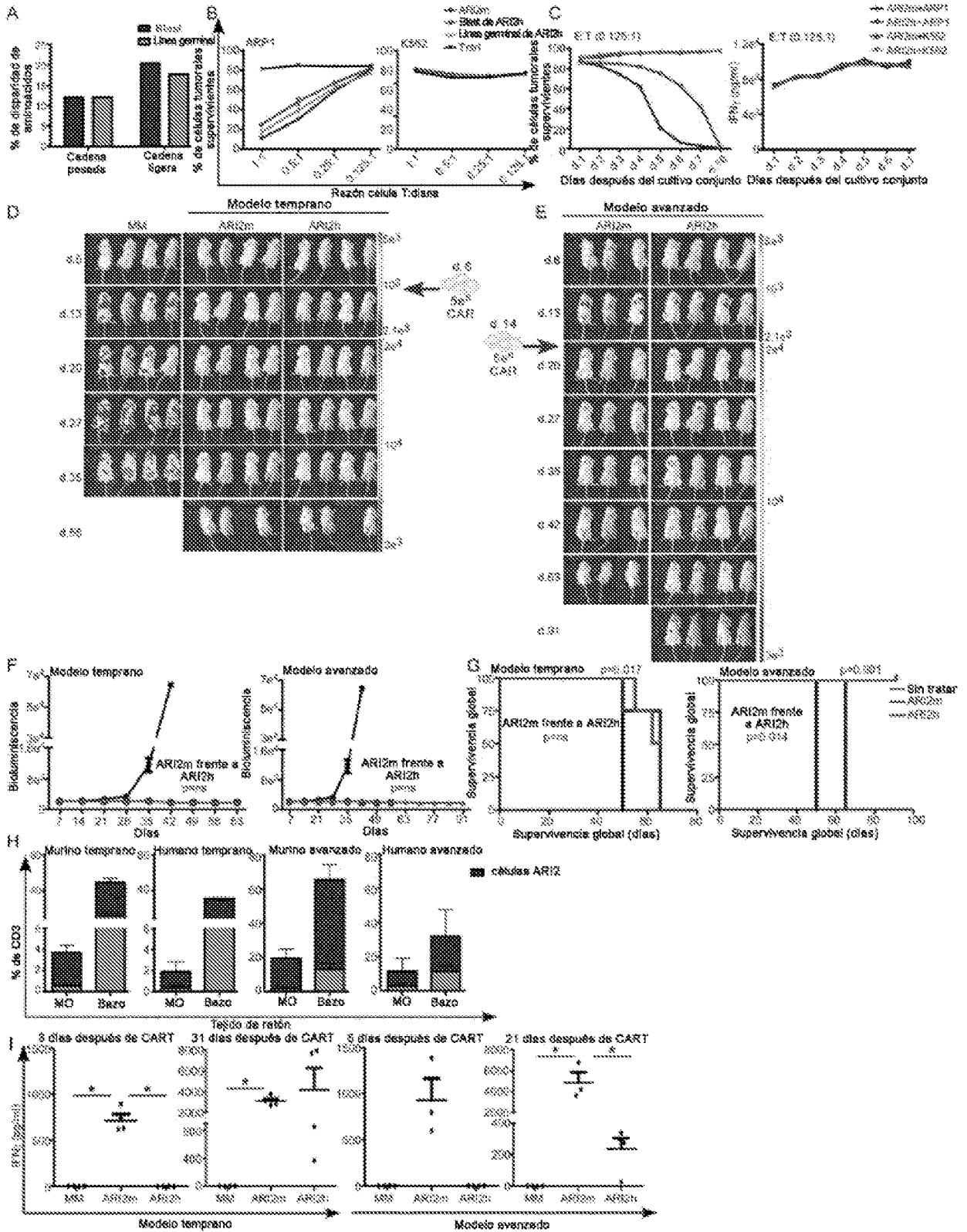


Figura 2

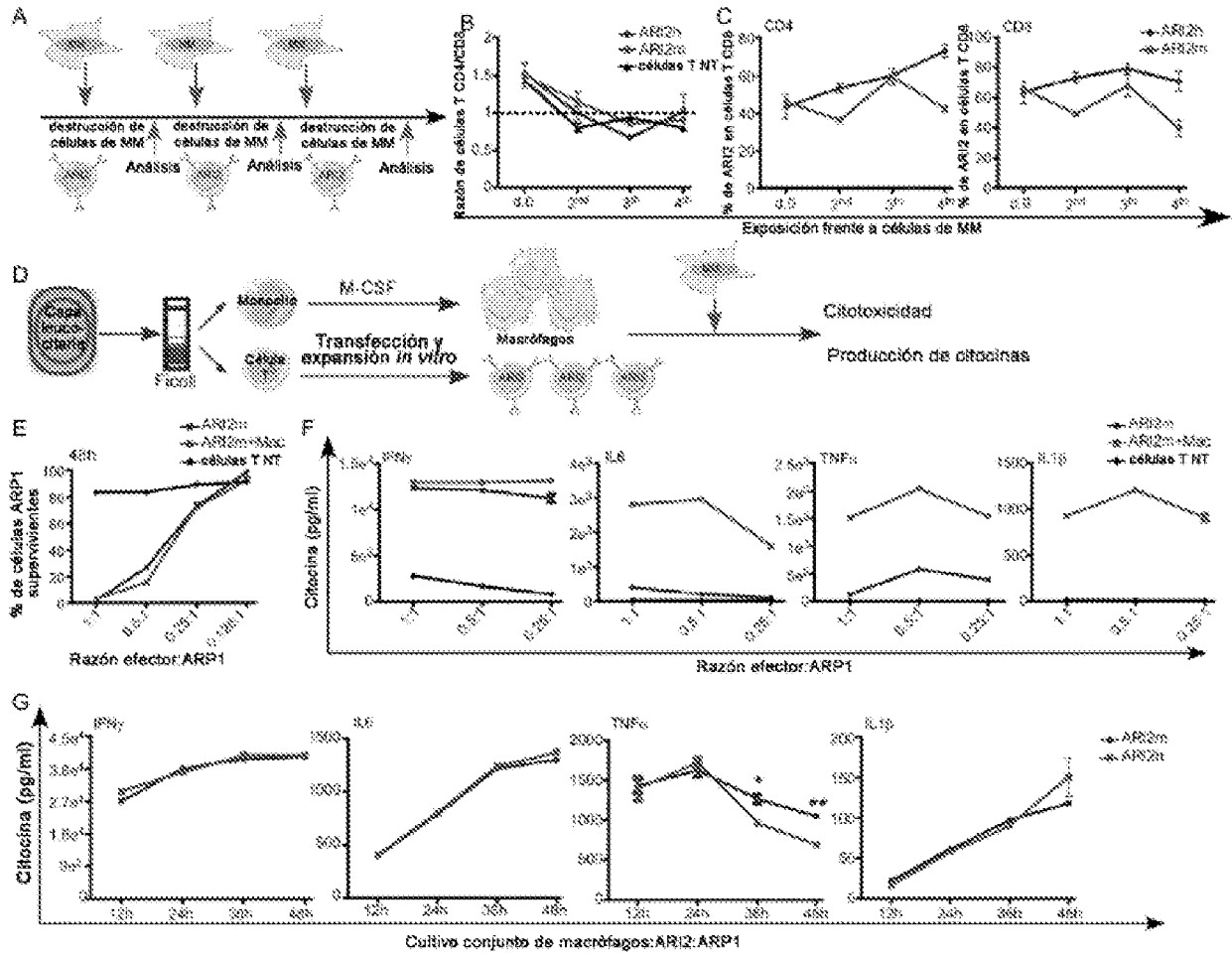


Figura 3

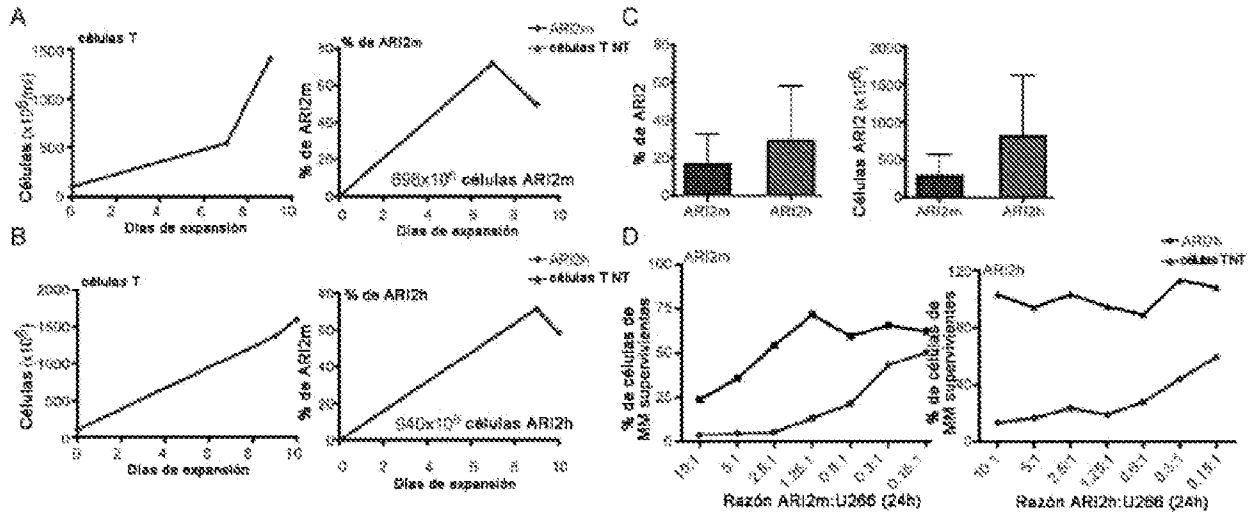


Figura 4

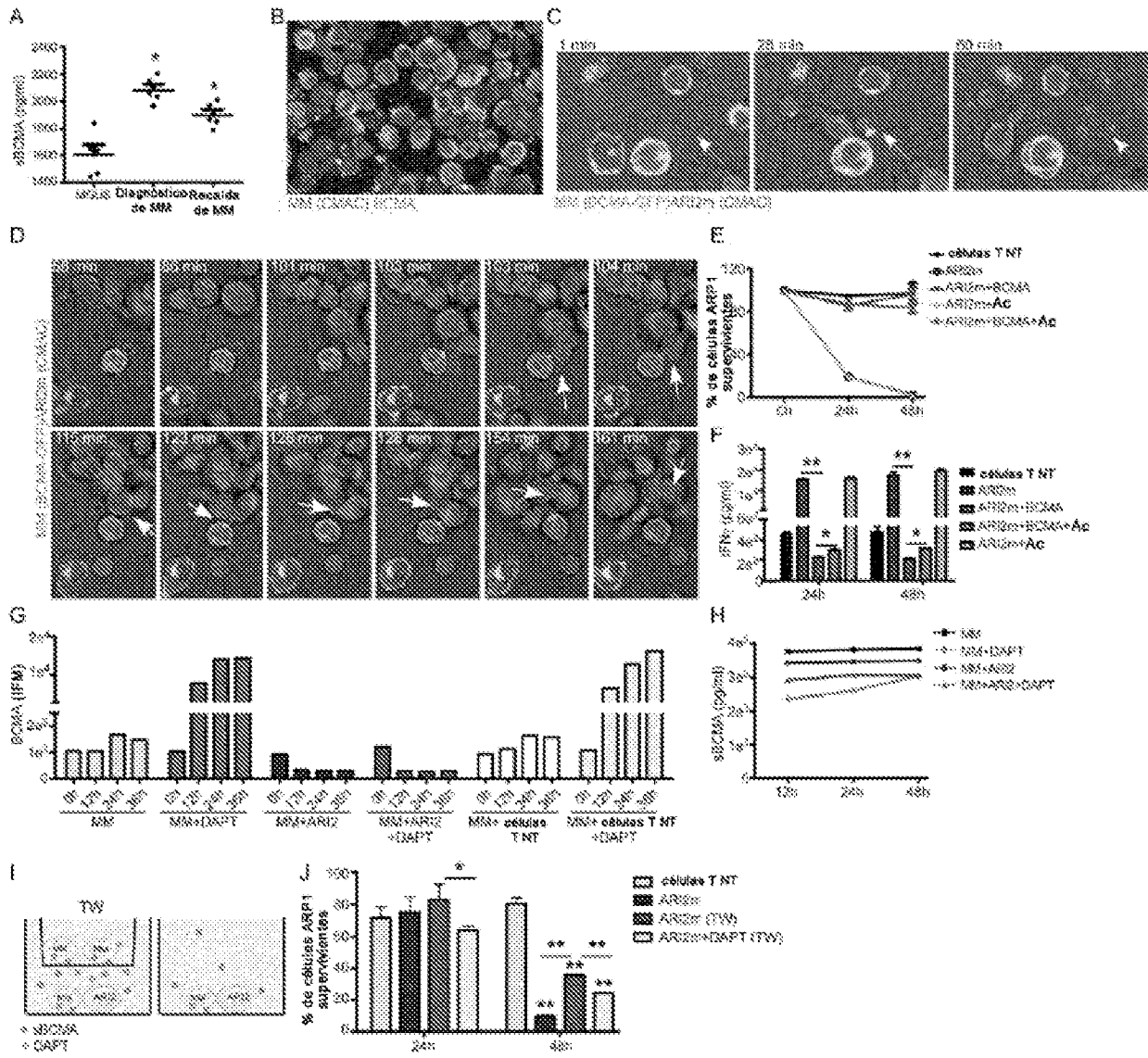


Figura 5

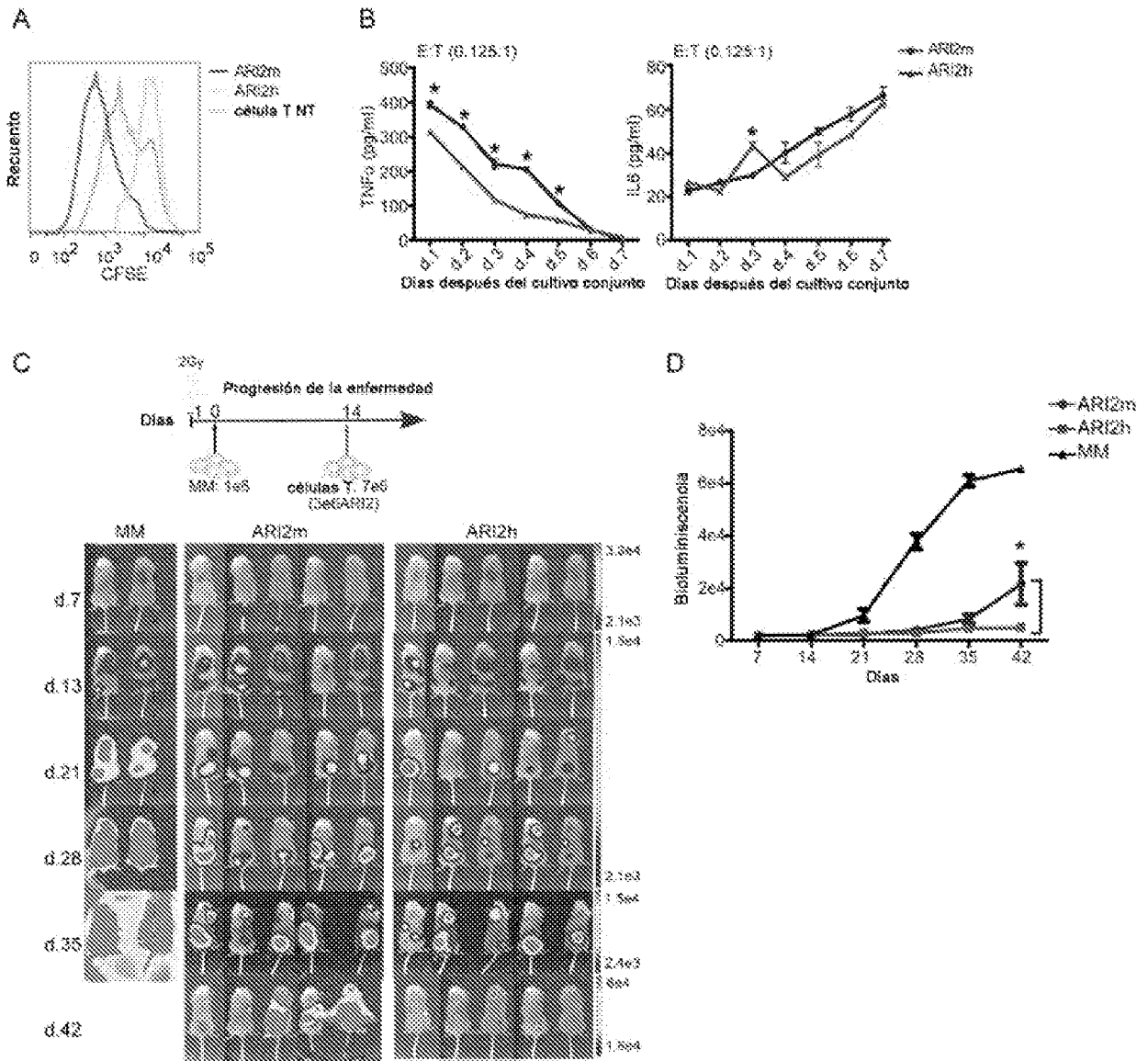


Figura 6